

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE
LA GLÍA ENVOLVENTE DEL BULBO OLFATORIO
DE LA RATA ADULTA**

Tesis presentada por:

DAVID ROSADO CHACÓN

Para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

REG. FM. 18143

Directores de la Tesis:

MANUEL NIETO SAMPEDRO Y JUAN LERMA GÓMEZ

MADRID, 1998

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó así: ~~presente~~ Tesis Doctoral
con la censura de ~~Sobresale este~~ "Cum laude" por

Madrid, 22 enero 1999 - unanimidad

J. L. Balle

M. T. Ming
[Signature]

[Signature]

Shelburne

Alea iacta est...

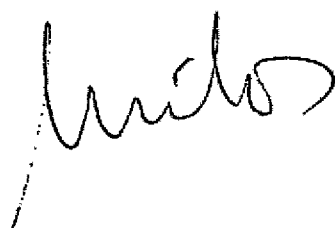
COMISIÓN DE DOCTORADO
Univ. Autónoma de Madrid

Madrid, 21 de Septiembre de 1998

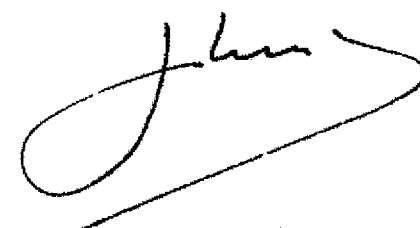
Manuel Nieto Sampedro, Profesor de Investigación del CSIC y Juan Lerma Gómez, Investigador Científico, ambos con destino en el Instituto Ramón y Cajal de Neurobiología,

CERTIFICAN: Que el trabajo de investigación propuesto como Tesis Doctoral por Don David ROSADO CHACÓN, realizado bajo nuestra dirección, contiene las siguientes aportaciones originales:

- 1) La caracterización de las propiedades electrofisiológicas pasivas de la membrana de los distintos fenotipos morfológicos de glia envolvente del bulbo olfatorio de rata a tiempos crecientes en cultivo primario.
- 2) La caracterización de las corrientes iónicas presentes en los distintos fenotipos morfológicos de células de glia envolvente del bulbo olfatorio de rata a tiempos crecientes en cultivo primario.
- 3) El estudio de la influencia de fragmentos de membrana neuronal sobre las corrientes iónicas presentes en células de glia envolvente a distintos tiempos en cultivo primario.
- 4) El estudio de la influencia del co-cultivo de la glia envolvente con células de neuroblastoma N2A sobre las corrientes iónicas presentes en las células gliales a distintos tiempos en cultivo primario.



Fdo. Manuel Nieto Sampedro



Juan Lerma Gómez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar dedico esta tesis especialmente a mis padres y a mi novia que siempre me han apoyado en los momentos difíciles y sin los cuales no hubiera podido hacer esta tesis doctoral.

Quiero darle las gracias a mis directores de tesis doctoral; los Drs. Manuel Nieto Sampedro y Juan Lerma Gómez por darme la posibilidad de hacer la tesis doctoral en su laboratorio.

Tengo también un agradecimiento especial para Agnés Gruart i Masó y el resto de miembros del Laboratorio de Neurociencia que me han dado buenos consejos para la edición de este trabajo.

Asimismo, agradezco a los miembros del departamento de Morfología su ayuda con el papeleo y el haberme soportado durante los cursos de doctorado...¡Qué no es poco!

También les quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio la ayuda que me han prestado durante estos años, en especial a Pepe Abad y a Graciela Gudíño por sus consejos técnicos; sin olvidar a Javi Méndez y su especial habilidad para “clavar” la osmolaridad de las soluciones salinas.

Tampoco puedo olvidar la ayuda prestada por Javier y el resto del personal del laboratorio del Dr José Rodrigo con los programas de ordenador y la neuroanatomía.

Quiero agradecer también la ayuda prestada a los miembros del laboratorio de Washintong Buño y de Juan Lerma por su ayuda técnica y conceptual en el aprendizaje de las técnicas electrofisiológicas.

... y finalmente, se lo agradezco de todo corazón a todos esos amigos nuevos que he conocido aquí en Madrid y a los de toda la vida de Sevilla que anónimamente me han ayudado tanto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.- Antecedentes históricos y generales.....	4
1.2.- Caracteres inmunocitoquímicos y funcionales que diferencian la glía envolvente de los astrocitos y de las células de Schwann.....	5
1.3.- Corrientes iónicas y propiedades eléctricas pasivas de las células gliales.....	8
1.4.- Propiedades electrofisiológicas de astrocitos y células de Schwann.....	11
1.5.- Regulación neuronal de la expresión de canales iónicos operados por voltaje en los astrocitos y en las células de Schwann.....	12
2.- OBJETIVOS.....	15
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.- Cultivos primarios y purificados de glía envolvente de las capas glomerular y de los nervios olfatorios del bulbo olfatorio de la rata adulta.....	18
3.2.- Cocultivo de Neuro-2A con glía envolvente.....	19
3.3.- Obtención de fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios.....	19
3.4.- Registro y adquisición de datos.....	21

3.5.- Cuantificación del número de células y análisis estadístico de los datos.....	24
4.- RESULTADOS.....	26
4.1.- Corrientes macroscópicas de potasio operadas por voltaje.....	27
4.2.- Corrientes macroscópicas de calcio y cloro operadas por voltaje.....	41
4.3.- Estudio morfológico: subpoblaciones y acoplamiento entre células de la glía envolvente.....	46
4.4.- Evolución temporal de las corrientes macroscópicas de potasio.....	53
4.5.- Evolución temporal de las corrientes macroscópicas de calcio y cloro.....	53
4.6.- Comparación de las propiedades electrofisiológicas de la glía envolvente en cultivo primario y las inmunopurificadas magnéticamente.....	56
4.7.- Efecto de las fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios sobre las corrientes de potasio operadas por voltaje de la glía envolvente.....	61
4.8.- Efecto de las fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios sobre las corrientes de calcio y cloro operadas por voltaje de la glía envolvente.....	64
4.9.- Cocultivos de glía envolvente purificada con el neuroblastoma Neuro-2A: cambios observados en las células de Neuro-2A.....	67
4.10.- Cocultivos de glía envolvente purificada con el neuroblastoma Neuro-2A: cambios observados en las células de la glía envolvente.....	67

5.- DISCUSIÓN.....	74
5.1.- Características electrofisiológicas de la glía envolvente.....	75
5.2.- Características fenotípicas de la glía envolvente.....	81
5.3.-Cocultivos de glía envolvente con la línea de neuroblastoma	
Neuro-2A.....	82
6.- CONCLUSIONES.....	88
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	91

ABREVIATURAS

AMP	Monofosfato de Adenosina cíclico
4-AP	4-aminopiridina
GGF+F	Factor de crecimiento glial + forskolina
CGNO	Capa glomerular y de los nervios olfatorios
D/F+10S	Mezcla 1/1 en volumen de Dulbecco's Modified Eagle's medium/ Ham's F-12, más un suplemento de glutamina (2 mM), estreptomicina (50 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y 10% de suero fetal bovino
EGTA	Ácido Etilenglicol-bis (β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-Tetra acético
E-NCAM	Forma embrionaria de la molécula de adhesión neural
GFAP	Filamentos de proteína ácida fibrilar de la glía
HBSS	Tampón de Hank
HEPES	Ácido 2-[4-(hidroxietil)-piperacil-(1)]-etansulfónico
HVA	Corriente de calcio de alto umbral de activación
I_r	Corriente de tipo rectificador de entrada
I_{KD}	Corriente de tipo rectificador retardado
LVA	Corriente de calcio de bajo umbral de activación
NCAM	Molécula de adhesión neural
PBS	Salino con tampón fosfato
p75	Receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
STX	Saxitoxina
TEA	Tetraetilamonio

TTX.....Tetrodotoxina

V_m.....Potencial de membrana

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-Antecedentes históricos y generales

Blanes (1898) estudió la glía del bulbo olfatorio, basándose en métodos histológicos donde observó dos poblaciones neurogliales, una con morfología estrellada y otra fusiforme. La primera se distribuía en todas las capas del bulbo olfatorio, mientras que la segunda se localizaba exclusivamente en el nervio olfatorio y en la capa de los nervios olfatorios. Este autor propuso, también, que la función de estas células podría ser aislar a los axones olfatorios de los otros tipos celulares de esta región.

Estudios más recientes sobre la ultraestructura del bulbo olfatorio (Doucette, 1984; Valverde y López-Mascaraque, 1991) han revelado que también astrocitos, oligodendrocitos y microglía existe un tipo especial de macroglía presente en las capas glomerular y de las fibras olfatorias denominada glía envolvente o glía de Blanes. Estas células se caracterizan en la escala ultramicroscópica por las siguientes propiedades: su citoplasma es más electrón denso que el de los astrocitos adyacentes, los filamentos citoplásmicos están dispersos, tienen el núcleo lobulado y la cromatina se encuentra distribuida uniformemente, salvo una ligera concentración inmediatamente debajo de la membrana nuclear.

Las células de la glía envolvente provienen de precursores de la plácoda olfatoria, lo que las distingue de las células de Schwann y de los astrocitos. Las células de Schwann se generan a partir de precursores de la cresta neural (Jessen y Mirsky, 1991) y los astrocitos se derivan de células de la capa subventricular de la vesícula cerebral (Cameron y Rakic, 1991).

La glía envolvente envuelve a los axones olfatorios, los aísla de otros tipos celulares presentes y promueve el crecimiento axonal a lo largo de la vía olfatoria hasta su primera

estación sináptica dentro del sistema nervioso central (SNC): el glomérulo olfatorio (Doucette, J. R., 1984; 1990). La glía envolvente no sólo envuelve axones olfatorios y promueve su crecimiento, asimismo, trasplantada en zonas lesionadas del SNC, es capaz de impulsar la regeneración de los axones sensoriales dañados, procedentes de raíces dorsales de la médula espinal lesionadas. Los axones, en estas condiciones, son capaces de cruzar áreas fuertemente inhibitorias del crecimiento axonal (Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1994; Doucette, 1995). Recientemente, Li y col. (1997) han logrado regenerar el tracto corticoespinal usando trasplantes de este tipo glial.

1.2.- Caracteres inmunocitoquímicos y funcionales que diferencian la glía envolvente de astrocitos y de las células de Schwann

La glía envolvente madura tiene propiedades inmunocitoquímicas y funcionales muy definidas y expresa caracteres específicos tanto de los astrocitos como de células de Schwann, de ahí que haya existido un amplio debate sobre si pertenecen a la familia de los astrocitos (Doucette, 1984) o a la de las células de Schwann (Barber y Lindsay, 1982; Pixley, 1992). Sin embargo, hay un conjunto de caracteres que permiten diferenciarlas de estos dos tipos celulares.

Las células de la glía envolvente de animales adultos contienen GFAP y vimentina (Barber y Lindsay, 1982; Liesi, 1985) y son inmunoreactivas con anticuerpos contra la cadena $\alpha 2$ de la laminina (Liesi, 1985; Hagg y col., 1997), con anticuerpos contra 1E8 (Norgren y col., 1992) y con anticuerpos contra el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso, la proteína p75 (Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1992). Los astrocitos maduros no poseen vimentina, tampoco expresan laminina, ni p75 (Assoulini y Pantazis, 1989; Norgren

y col., 1992; Barnett y col., 1993).

Las células de Schwann no mielinizantes, al igual que la glía envolvente, expresan laminina, L1, y p75 *in vivo* e *in vitro*, y ambas contienen vimentina entre sus filamentos intermedios (Assoulini y Pantazis, 1989; Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1992). Por el contrario, las células de Schwann expresan galactocerebrósido y reaccionan con el anticuerpo HNK-1, pero no contienen el tipo central de GFAP. La glía envolvente no es positiva para HNK-1 y posee el tipo central de GFAP en sus filamentos intermedios (Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1992).

Se ha demostrado recientemente (Francheschini y Barnett, 1996) que la expresión de la p75 y de la forma embrionaria de la proteína de adhesión NCAM (PSA-NCAM o E-NCAM) definen dos tipos de glía envolvente derivadas de una línea embrionaria común en el bulbo olfatorio. La población que muestra marcaje para p75 muestra características parecidas a las de las células de Schwann y las que se marcan para la E-NCAM presentan características similares a los astrocitos, observables tanto en cultivo como en estudios *in vivo*. Estos marcadores se mantienen a lo largo de la vida del animal mientras que, en el caso de astrocitos y de las células de Schwann, sólo expresan estos marcadores en ciertas condiciones como lesiones de desmielinización o en estados postnatales de mielinización (Ouesmar y col., 1995). La glía envolvente es el único tipo glial capaz de sintetizar carnosina en grandes cantidades en la capa glomerular y en la de los nervios olfatorios. A la carnosina se le atribuye un papel neuromodulador sobre la transmisión sináptica olfatoria (Sassoè-Pognetto y col., 1993; Bakardjiev, 1997).

Las características funcionales de la glía envolvente son diferentes tanto de las de los astrocitos como de las células de Schwann. Los astrocitos y glía envolvente poseen lámina

basal sólo en los puntos donde contribuyen a formar la *glía limitans* en el bulbo olfatorio y en los puntos donde forman los pies vasculares alrededor de los vasos sanguíneos (Doucette, 1984, 1991). Por el contrario, la glía envolvente, en la capa de nervios olfatorios del bulbo, es la única que contacta y envuelve grupos densamente empaquetados de axones olfatorios en el bulbo olfatorio. Además, la glía envolvente trasplantada es capaz de migrar largas distancias desde el sitio de inyección a través del SNC de rata adulta (Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1994; Gudiño Cabrera y Nieto Sampedro, 1996).

Las células de Schwann se diferencian de la glía envolvente desde el punto de vista funcional por las siguientes razones: la glía envolvente en cultivo expresa ligeramente galactocerebrósido en estado basal y no aumenta su expresión cuando se expone a dibutilil-AMP cíclico, mientras que las células de Schwann exhiben un fuerte incremento de su expresión en estas condiciones (Barnett y col., 1993; Bakardjiev, 1997). Aunque la glía envolvente presenta lámina basal allí donde forma parte de la *glía limitans* del bulbo olfatorio, también se entremezcla con los astrocitos sin presentar una lámina basal que separe las membranas plasmáticas de ambos tipos celulares (Doucette, 1990). Las células de Schwann, por el contrario, son excluidas del SNC por una *glía limitans*. Cuando las membranas plasmáticas de los astrocitos y las células de Schwann están en aposición, son separadas por una lamina basal que envuelve a la célula de Schwann y la aísla del SNC (Raisman, 1985; Doucette, 1990, 1991; Franklin y Blakemore, 1993).

Todos los datos indicados anteriormente sugieren que la glía envolvente es un tipo celular distinto de las células de Schwann y de los astrocitos y es único por su capacidad de promover la regeneración axonal en áreas lesionadas del SNC. A pesar de esto, quedan características fenotípicas que aún no han sido estudiadas, entre las que están sus propiedades

electrofisiológicas, que podrían contribuir a un conocimiento más profundo de los mecanismos que determinan esta capacidad regenerativa.

Pasemos a repasar las propiedades electrofisiológicas generales de las células macrogliales con las que la glía envolvente comparte más características fenotípicas: los astrocitos y las células de Schwann.

1.3.- Corrientes iónicas y propiedades eléctricas pasivas de las células gliales

Los canales iónicos operados por voltaje forman una gran familia de proteínas integrales de membrana plasmática con grandes homologías en su estructura y en su mecanismo de acción. La estructura básica de estos poros permeables a iones está basada en un conjunto de secuencias o motivos comunes a todos los miembros: poseen cuatro dominios de transmembrana homólogos, compuestos probablemente por seis alfa hélices que envuelven a un poro iónico central permeable a iones. En los canales de potasio, cada dominio es un producto génico y el canal funcional está formado por un homo- o heterotetrámero. En los canales de sodio y calcio, una sola subunidad alfa contiene los cuatro dominios de transmembrana y los que forman el poro. Asimismo, cada subunidad o tetrámero de subunidades alfa llevan asociadas otras subunidades accesorias. Las funciones básicas del canal, igual que la conductancia iónica, la activación e inactivación dependiente de voltaje están asociadas a las subunidades alfa, las subunidades accesorias parecen tener un papel modulador de estas propiedades funcionales (Catterall, 1995).

Las corrientes iónicas dependientes de voltaje se clasifican atendiendo a su selectividad iónica, a su cinética de activación y de inactivación y según sea su sensibilidad al bloqueo por fármacos. Las corrientes iónicas dependientes de voltaje presentan una

propiedad llamada rectificación, definida como una dependencia no lineal entre la corriente observada y el potencial de membrana. Debido a esta propiedad, los canales que son rectificadores de salida dejan pasar más corriente cuando el potencial de membrana (V_m) sube a valores positivos respecto al de reposo. Los rectificadores de entrada lo hacen cuando el V_m se hiperpolariza respecto al potencial de reposo. El aumento de la conductancia de los canales iónicos, hasta el máximo valor del mismo no es abrupto, es paulatino, debido a que el sensor de voltaje de los canales iónicos operados por voltaje no detectan de forma precisa los cambios del potencial de membrana (Hille, 1992).

Las células macrogliales se caracterizan una alta permeabilidad selectiva a iones de potasio y por tener, en general, un potencial de membrana más negativo que las neuronas. No poseen actividad eléctrica regenerativa, es decir, no son capaces de generar y conducir potenciales de acción, a pesar de que su membrana expresa canales de sodio y potasio operados por voltaje (Barres y col. 1990; Duffy y col. 1995).

Las corrientes macroscópicas encontradas con más frecuencia en la macroglía son las siguientes (Chiu, 1991; Hille, 1992; Duffy y col., 1995; Sontheimer y Ritchie, 1995; Sontheimer y col., 1996):

- Corriente de tipo rectificador retardado (I_{KD}): es una corriente de salida de potasio, que se caracteriza por activarse al despolarizar la membrana por encima de -40 mV. Su conductancia se incrementa entonces con el tiempo siguiendo una función de forma sigmoidal. Su inactivación es mínima frente a las despolarizaciones sostenidas. Se bloquea con cesio intracelular y con tetraetilamonio (TEA) y 4-aminopiridina extracelulares (4-AP).

- Corriente de potasio transitoria o de tipo A (I_A): como se ha descrito en neuronas, esta corriente de salida se activa e inactiva rápidamente al despolarizar la membrana, y

requiere una hiperpolarización transitoria, previa al pulso de estimulación, para eliminar la inactivación de la corriente. Su cinética de activación es similar a la corriente de tipo rectificador retardado y es bloqueada por cesio y 4-AP intracelulares, o por 4-AP extracelular.

- Rectificador anómalo: es una conductancia selectiva al potasio, que se activa al hiperpolarizar la membrana dentro de valores cercanos al potencial de membrana en reposo. Su conductancia se incrementa con el tiempo de forma sigmoideal. Hay algunas isoformas de los canales pueden presentar inactivación rápida al estimular con pulsos fuertemente hiperpolarizantes. Se bloquea con bario y cesio extracelulares.

- Corrientes de sodio dependientes de voltaje: son corrientes de entrada que se activan al despolarizar la célula, alcanzando un pico de conductancia e invirtiendo el signo de la corriente (de negativa a positiva) cuando se sobrepasa su potencial de equilibrio. Existen dos isoformas: una de ellas se activa y se inactiva rápidamente y es totalmente bloqueada por TTX y STX en el rango nM; la otra isoforma es resistente a estas toxinas (bloqueo total en el rango μ M) y tiene una cinética más lenta.

- Corrientes de calcio: se activan por despolarización y como las anteriores, alcanzan un valor máximo e invierten su polaridad al llegar al potencial de equilibrio. Existen dos familias según su rango de activación: las corrientes LVA, o de tipo T, se caracterizan por su activación rápida a potenciales superiores a -60 mV, inactivándose después de alcanzar un máximo de corriente (su observación requiere la aplicación de un prepulso hiperpolarizante, para eliminar la inactivación de estos canales). La segunda familia son las corrientes HVA, que se observan al aplicar voltajes de membrana superiores a -40 mV. Estas corrientes presentan poca (tipo N) o ninguna inactivación (tipo L) con pulsos despolarizantes de larga duración y se bloquean de forma inespecífica con iones de metales pesados (cadmio,

mercurio, cobalto). La corriente L es bloqueada específicamente por dihidropiridinas aplicadas al medio extracelular y las corrientes N y T son bloqueadas extracelularmente por conotoxinas.

1.4.- Propiedades electrofisiológicas de astrocitos y células de Schwann

Las propiedades electrofisiológicas de astrocitos y de las células de Schwann, células que comparten algunos caracteres fenotípicos y funcionales con la glía envolvente, han sido ampliamente estudiadas en cultivo y en preparaciones *in situ*. Ambos tipos gliales poseen canales iónicos operados por voltaje, con propiedades de activación, de inactivación y de canal unitario similares a las neuronas (Duffy y col., 1995; Sontheimer y Ritchie, 1995).

Kettenmann y col. (1982) registraron la actividad de los canales iónicos aislados mediante la técnica de registro en zona (*Patch-Clamp*), demostrando por primera vez que un tipo glial de mamífero, los oligodendrocitos, expresaban canales iónicos en su membrana. Los canales iónicos operados por voltaje, en los astrocitos y en las células de Schwann, han sido estudiados ampliamente; así, Chiu y col. (1984) fueron los primeros que presentaron una evidencia directa de que las células de Schwann en cultivo tenían una relación no lineal corriente-voltaje (I-V), observando que poseen corrientes de sodio y de potasio dependientes de voltaje, similares a las que presentan las neuronas. En las mismas células, Konishi (1989) observó que los patrones de expresión de cada tipo de corriente varían entre las distintas especies de mamíferos estudiados (rata, ratón, conejo y humano). Los trabajos realizados en el mismo período, demostraron que los astrocitos de los tipos 1 y 2, también, expresaban corrientes de potasio, de sodio y de cloruro, operadas por voltaje, con patrones de expresión distintos en cada tipo astrogliar (Bevan y Raff, 1985; Bevan y col., 1985).

Los astrocitos, tanto en la sustancia blanca como en la materia gris, expresan varios tipos de corrientes de potasio: rectificadores retardados, rectificadores anómalos y corrientes transitorias. El rectificador anómalo juega, probablemente, un papel dominante en el mantenimiento del potencial de reposo, ya que es el único canal que posee una gran probabilidad de apertura cerca del potencial de equilibrio para el potasio. La función del resto de canales de potasio en los astrocitos no está clara (Duffy y col. 1995). Por contra, la proliferación de los astroblastos en cultivo se reduce al bloquear mediante TEA ó 4-AP las corrientes de salida de potasio (Pappas, 1994). Las células de Schwann expresan en su membrana diversos tipos de corrientes de potasio: corrientes de tipo rectificador retardado sensibles a 4-AP (Baker y col., 1993), un rectificador anómalo y corrientes transitorias (Konishi, 1990; Amédée y col., 1991).

Las células de Schwann y los astrocitos expresan corrientes de sodio y de calcio *in situ*. Por contra, estas células, en cultivo sólo expresan corrientes de sodio cuando se cocultivan con neuronas o se añade medio condicionado por neuronas. Algunas corrientes de calcio se expresan constitutivamente, mientras que en otros tipos de esta corriente, su presencia está modulada por agentes que aumentan los niveles de AMPc o por la presencia de neuronas o factores solubles liberados por ellas.

1.5.- Regulación neuronal de la expresión de canales iónicos operados por voltaje en astrocitos y en células de Schwann

En el sistema nervioso de los vertebrados las neuronas, las células gliales y otros tipos celulares, comparten un medio ambiente común a través de los espacios extracelulares. La membrana plasmática de las neuronas y de sus prolongaciones está en aposición con el

plasmalema de los astrocitos y de sus procesos en el SNC (Black y col., 1989) y a las células de Schwann en el Sistema Nervioso Periférico (Ritchie y col., 1990).

La expresión de canales iónicos operados por voltaje en las células gliales está modulada por la presencia de neuronas, bien por contacto con su membrana, bien por factores solubles liberados por éstas al espacio extracelular.

Los cultivos de astrocitos obtenidos del nervio óptico, privados del contacto axonal por enucleación del nervio óptico, presentan menor expresión de los canales de sodio operados por voltaje. Estos cultivos, también, están enriquecidos en astrocitos de tipo 1, sugiriendo que la presencia neuronal es esencial para la supervivencia de los astrocitos de tipo 2, que forma parte de la neuroglía de los nervios ópticos no enucleados (Corvalan y col., 1990; Minturn y col., 1992; Ransom y Orkand, 1996). Por el contrario, otros experimentos muestran que la corriente macroscópica de sodio y de potasio de los astrocitos obtenidos de médula espinal disminuye al cocultivarlos con neuronas, o al tratarlos con medio condicionado por neuronas (Thio y col., 1993).

Las células de Schwann también se ven influidas por el contacto con axones. Estas células, cuando están en cultivo organotípico unidas a neuritas, expresan una corriente de potasio transitoria, mientras que sólo una minoría la expresa cuando no están en contacto con la neurita (Despeyroux y col., 1994). El estado proliferativo y el de mielinización afectan a la expresión de los canales operados por voltaje. Así, todas células de Schwann no mielinizantes aisladas agudamente expresan corrientes inactivantes de sodio y un rectificador retardado, mientras que estas corrientes en las mielinizantes no son detectables. También, parece esencial el contacto axonal para la expresión de canales funcionales del tipo rectificador anómalo (Chiu, 1991; Wilson y Chiu, 1993). En las células de Schwann en

cultivo, los factores mitogénicos (fragmentos de mielina, axonales y GGF+Forskolina) incrementan las corrientes de sodio y potasio dependientes de voltaje, paralelamente a la respuesta proliferativa. El aumento de expresión de estos canales para la proliferación de dichas células es esencial, ya que el bloqueo de estas corrientes produce una disminución fuerte de la división celular (Wilson y Chiu, 1993).

Cuando un nervio periférico se lesiona se produce un fenómeno conocido como degeneración walleriana. En estas circunstancias se produce la fagocitosis macrofágica de los axones y de las vainas de mielina. Las células de Schwann entran en mitosis acompañando a los brotes axonales en crecimiento (Salzer y Bunge, 1980; Bunge 1987; Komiyama y Suzuki, 1992). Trabajando con células de Schwann obtenidas después de dejar varios días un explante de nervio ciático en cultivo, Chiu y Wilson (1989) observaron que la expresión de corrientes de sodio y de potasio dependientes de voltaje aumentaron, alcanzando un pico en el momento en que se alcanzó el valor máximo de proliferación celular.

Vistas las diferencias entre la glía envolvente, los astrocitos y las células de Schwann en cuanto a sus propiedades inmunocitoquímicas, funcionales y de regulación de los canales iónicos, en el capítulo de resultados, describiremos cuáles son las propiedades electrofisiológicas de la glía envolvente en cultivo primario, las subpoblaciones definidas por estas propiedades y la regulación de la expresión de las corrientes operadas por voltaje debida al contacto axonal.

OBJETIVOS



2.- OBJETIVOS

- 1.- Caracterización eletrofisiológica de la glía envolvente del bulbo olfatorio en cultivo primario:
 - 1.1.- Estudio de las propiedades pasivas y de las corrientes macroscópicas
 - 1.2.- Estudio de la evolución de los fenotipos electrofisiológicos con la edad del cultivo
- 2.- Evaluación del efecto producido por presencia de fragmentos axonales en los cultivos primarios de bulbo y de glía envolvente purificada:
 - 2.1.- Comparación de las corrientes macroscópicas y la distribución de los fenotipos gliales con los cultivos de glía envolvente purificada y los cultivos primarios.
 - 2.2.- Estudio de las variaciones de las corrientes macroscópicas y de la distribución de los fenotipos gliales envolvente en presencia de fragmentos de axones olfatorios.
- 3.- Estudio del efecto del cocultivo de glía envolvente purificada con líneas celulares de origen neuronal
 - 3.1.- Estudio de los cambios morfológicos de la glía envolvente purificada cocultivada con el neuroblastoma Neuro-2A.
 - 3.2.- Cambios en las corrientes expresadas en la glía envolvente en cocultivo con la línea Neuro-2A de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Cultivos primarios y purificados de glía envolvente de las capas glomerular y de los nervios olfatorios del Bulbo Olfatorio de la rata adulta

El tejido requerido para estos cultivos se obtuvo de ratas Wistar de dos meses y medio de edad, que fueron sacrificadas en una atmósfera de CO₂. Los bulbos olfatorios se disecaron en tampón de Hank (HBSS) con calcio y magnesio, se retiró cuidadosamente la membrana pial y se disecaron juntas las capas glomerular y la de los nervios olfatorios. El tejido se lavó con HBSS sin calcio, ni magnesio y se trocó en pequeñas piezas. Después de una incubación de 10 minutos con tripsina (*Sigma Chemical Co.; St Louis, MO, USA*; 0.1 % peso/volumen) a temperatura ambiente, el tejido se disgregó, pipeteando repetidamente con una pipeta Pasteur. La digestión enzimática se detuvo añadiendo medio de cultivo (mezcla 1/1 en vol. de Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12), al que se añadió glutamina (2 mM), penicilina (50 IU/ml), estreptomicina (50 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y suero fetal bovino al 10% (v/v). Finalmente, las células disociadas se centrifugaron a 200 x g, durante 7 minutos y se resuspendieron en el medio de cultivo (D/F+10S). Las células de cada bulbo olfatorio se sembraron en 6 placas de Petri de 35 mm (*Nunc; Roskilde, DK*) pretratadas con p-L-Lisina (*Sigma*; peso molecular promedio. 25.000; 10 µg/ml, en 15 mM de tampón de boratos, pH 8.4). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ saturada con vapor de agua. Después de siete días *in vitro* se identificaron claramente las células de glía envolvente en un microscopio equipado con contraste de fase.

La glía envolvente se purificó inmunomagnéticamente mediante el protocolo descrito

en trabajos anteriores de este laboratorio (Gudiño Cabrera y Nieto Sampedro, 1996). Las células así obtenidas se sembraron en placas de 35 mm de diámetro para registro electrofisiológico o se cocultivaron con líneas de neuroblastoma.

3.2.- Cocultivo de Neuro-2A con glía envolvente

La línea celular usada fue el neuroblastoma de ratón Neuro-2A. Esta línea se expandió primero en placas de Petri Falcon para cultivos celulares (*Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA*) y se alimentaron con el medio de cultivo D/F+10S, que se cambió cada dos días. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, saturada con vapor de agua, hasta que alcanzaron la confluencia; es decir, hasta que la totalidad de la superficie de la placa de cultivo estuvo ocupada por células. Éstas se despegaron de la superficie de la placa mediante un pipeteado vigoroso con el medio de cultivo y se determinó la cantidad de células de la suspensión obtenida con un hemocitómetro. Después, las células de neuroblastoma se sembraron en las placas Falcon, o bien, se cocultivó con glía envolvente purificada, de tal forma que los cocultivos contuvieran una célula de Neuro-2A por cada ocho células de glía envolvente. Después de dos o tres días *in vitro* éste cocultivo se usó para hacer los registros electrofisiológicos.

3.3.- Obtención de fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios

El tejido necesario para obtener las fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios se obtuvo mediante un procedimiento similar al utilizado para la obtención del tejido en los cultivos primarios. Se disecaron cuidadosamente las capas glomerular y de

nervios olfatorios del bulbo olfatorio de la rata, se lavaron en salino con tampón fosfato frío (PBS, pH 7,4) y se trocearon en pequeñas piezas. Después, estos trozos de tejido sumergidos en PBS frío se congelaron y descongelaron varias veces para producir la lisis de las células. Finalmente, el tejido se homogeneizó a 4°C pipeteando vigorosamente con una pipeta Pasteur, cuya punta se estrechó y pulió, previamente, en un mechero Bunsen.

El homogeneizado de las capas glomerular y de los nervios olfatorios se añadió cuidadosamente a una solución de PBS/sacarosa 1M (contenida en un tubo de 1,5 ml) en una relación aproximada 1:3 (v/v), formándose una capa en la parte superior de esta solución. Posteriormente, el tubo con el homogeneizado se centrifugó en una Microfuga (*Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA*) a 13000 x g durante treinta minutos, obteniéndose un sobrenadante que se recogió en otro tubo. El sobrenadante recogido se lavó con el triple de volumen de PBS frío y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante quince minutos. A continuación, el nuevo sobrenadante se retiró y el residuo obtenido se resuspendió en 150 µl de PBS, del que se cogió una muestra de 25 µl para estimar el contenido proteico mediante el método colorimétrico de Bradford. Este método de estimación de la cantidad de proteínas de una muestra se basa en medir los cambios de color producidos cuando un colorante (el reactivo de Bradford) reacciona con las proteínas. Este colorante es de color marrón y conforme mayor es la concentración de proteínas mayor es el cambio de color hacia un azul intenso. La cantidad de proteína (en µg/ml) viene dada por una recta de calibración obtenida representando la absorción a 595 nm de longitud de onda, respecto a una serie de patrones de inmunoglobulina G de concentración conocida (0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,75 mg/ml). Seguidamente, se calcula la recta de regresión correspondiente con estos datos. La cantidad de proteína de la muestra extraída de la alícuota de fragmentos de

membrana, se obtiene sustituyendo el valor obtenido de la absorción a 595 nm de la muestra en la ecuación de la recta de regresión.

Cada placa de Petri con los cultivos de glía envolvente se trató durante 24 ó 48 horas con 3,5 µg de proteína de la alícuota de fragmentos de membrana de axones olfatorios, antes de ser registrados electrofisiológicamente.

3.4.- Registro y adquisición de datos

Los registros se obtuvieron usando la técnica de *Patch-Clamp* en la modalidad de célula entera. La placa de Petri de 35 mm de diámetro con células de glía envolvente de siete o más días *in vitro*, se colocó en una cámara de registro montada en un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania)*, equipado con contraste de fase. Los cultivos se perfundieron con la siguiente solución externa (en mM): ClNa 164, ClK 2.5, Cl₂Ca 1.8, Cl₂Mg 2, HEPES 10, Glucosa 10, ajustado a pH 7.4 con NaOH y una osmolalidad final de 330 mmol/Kg.

Para observar corrientes de Ca²⁺, se utilizó la siguiente solución de perfusión (mM): ClNa 140, TEA-Cl 20, Cl₂Ba 10, Cl₂Mg 1, HEPES 10, Glucosa 10, pH 7.4 ajustado con TEA-OH y con una osmolaridad final de 330 mosm/l.

Las micropipetas registro se obtuvieron estirando capilares de vidrio (borosilicato) de 0.6 mm de diámetro interno y 1.2 mm de diámetro externo (*World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA*) en un estirador horizontal *Sutter P-87 (Flaming-Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA)*. Las pipetas pulidas en el mismo aparato presentaron resistencias entre 3 y 4 MΩ al rellenarse, tanto con la solución habitualmente

usada para registro (en mM: ClK 135, ClNa 6, Cl₂Mg 3, KOH 7.3, HEPES 10, EGTA 0.5, pH 7.2; osmolaridad final de 320 mosm/l), como con la usada para desenmascarar las corrientes de Ca²⁺ mediadas por Ba²⁺ (en mM: ClCs 120, TEA-Cl 30, Cl₂Mg 1, HEPES 10, EGTA 10, pH 7.2; osmolaridad final de 320 mosm/l). En algunos experimentos, a la solución de registro de corrientes de potasio se añadieron soluciones bloqueantes de canales de potasio, mediante un sistema de perfusión. Estas soluciones se elaboraron sustituyendo equimolarmente el ClNa por 10 mM TEA-Cl, ó 5 mM 4-AP. También se preparó una solución bloqueante de canales de calcio al incluir 1 mM Cl₂Cd, que se sustituyó equimolarmente al ClNa, en la solución externa de bario. La punta de la pipeta se rellenó, en algunos experimentos con 1 mg/ml de Amarillo Lucifer (*Molecular Probes, Eugene, CO, USA*) para estudiar la morfología.

La diferencia de potencial que se establece entre las soluciones externa e interna de la pipeta (*junction potential*) se canceló mediante el sistema interno del amplificador. La resistencia del sello se consideró aceptable cuando su valor fue mayor a 3 GΩ, magnitud que se obtuvo, normalmente, aplicando una ligera succión a las pipetas después de establecer el sello de baja resistencia ($\approx 50 \text{ M}\Omega$).

El establecimiento de la configuración de célula entera se determinó eléctricamente por el incremento de la capacitancia en respuesta a pulsos de 10 mV, de 10 ms de duración y estableciendo el potencial de membrana a un valor de -60 mV antes de la ruptura del sello. La capacitancia de la pipeta, la de la membrana y la resistencia en serie se compensaron electrónicamente para minimizar los transitorios capacitivos. La resistencia en serie se compenso en un 60% en los casos en los que la resistencia en serie daba lugar a errores de voltaje. El valor de este error viene dado por el producto $R_s I_{\text{max}}$, donde R_s es el valor de la resistencia en serie e I_{max} es el valor de la máxima corriente de membrana obtenida en cada

registro.

La respuesta de la célula se registró mediante un amplificador Axopatch-200A (*Axon Instruments, Foster City, CA, USA*). Los pulsos de estimulación se generaron desde un ordenador, con el programa CLAMPEX (pCLAMP, *Axon Instruments*). Las corrientes macroscópicas se filtraron con un filtro Bessel de tres polos a 1 KHz, antes de ser digitalizadas por una interfase AD/DA *Digidata 1200 (Axon Instruments)* y registradas por el ordenador con una frecuencia de muestreo de 2 ó 4 KHz. Las corrientes de fuga y los capacitivos residuales se sustrajeron en línea (*On-line*) mediante un protocolo P/N antes de cada pulso de estimulación, donde P el valor del pulso de estimulación y N el número de pulsos.

Para identificar corrientes dependientes de voltaje se aplicaron los protocolos de pulsos de voltaje des- e hiperpolarizantes adecuados, que se describen en el texto y en los pies de las figuras.

La corriente (I) se midió en el pico, en el caso de corrientes transitorias, o se obtuvieron como el valor promedio de los 4 últimos milisegundos del pulso, en el caso de las sostenidas. Estas corrientes se transformaron en conductancia mediante la expresión $G = I / (V_m - E_N)$, donde V_m es potencial de membrana y E_N es igual al potencial de equilibrio, calculado de acuerdo a la ecuación de Nerst para cada ion.

$$E_N = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Ion]_{ext}}{[Ion]_{intr}}$$

Las representaciones gráficas de la conductancia normalizada respecto al voltaje y curvas h_∞ se ajustaron a una función de Boltzmann:

$$\frac{I}{I_{\max}} \text{ ó } \frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp \frac{(V_{1/2} - V_m)}{K}}$$

Donde G/G_{\max} es la conductancia normalizada respecto a la conductancia máxima (G_{\max}), $V_{1/2}$ es el potencial de membrana, en el que G/G_{\max} es igual a $1/2$, es decir, es el voltaje donde, estadísticamente, la mitad de los canales están activados en el estado estacionario o en el pico (si presenta inactivación rápida) de la corriente. K es la pendiente calculada por la expresión $K = RT/zF$. Las curvas I/I_{\max} o h_{∞} , obtenidas mediante el protocolo que se describe en el capítulo de resultados, se ajustaron a una ecuación de Boltzmann, como la anterior donde $V_{1/2}$ es el potencial de membrana en el cual la mitad de los canales de la membrana están inactivados en el estado estacionario. El resto de los parámetros tienen el mismo significado.

3.5.- Cuantificación del número de células y análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de la distribución de los fenotipos electrofisiológicos de la glía envolvente se realizó mediante la prueba estadística del χ^2 . Los cambios de la densidad de corriente con la edad del cultivo o con los tratamientos, se examinaron mediante un análisis de la varianza de una vía (*One-way ANOVA*). El coeficiente de correlación lineal (r) se usó como indicativo de asociación lineal entre la densidad de corriente y el tiempo en cultivo.

La densidad de células de morfología bipolar y multipolar en los cultivos de glía envolvente purificada se estudió en condiciones control y tratadas con membranas. Se determinó el promedio de células por campo, que se midió en tres campos elegidos al azar por

placa. Cada uno de los campos equivalía al área total observada por un ocular con retícula y, a su vez se promedió el resultado de tres placas con glía envolvente purificada. Estos promedios se compararon entre sí mediante un análisis de la varianza de una vía.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

La glía envolvente en cultivo primario presentó dos tipos morfológicos cuyo potencial de membrana promedio en reposo, obtenido al fijar la corriente a 0 pA, fue de -31 ± 3 mV ($n=21$), independientemente de la edad del cultivo. La resistencia de entrada (R_e) fue 1 ± 0.1 G Ω ($n=8$) con soluciones extra- e intracelulares fisiológicas.

Las células de la glía envolvente expresaron canales iónicos operados por voltaje, que se activaron mediante protocolos adecuados de estimulación, así se observaron corrientes macroscópicas de potasio, calcio y cloro, pero no se detectaron corrientes de sodio con las soluciones y protocolos usados en este trabajo.

4.1.- Corrientes macroscópicas de potasio operadas por voltaje

Los registros realizados en el soma de la glía envolvente en el modo de célula entera revelaron la existencia de corrientes de salida. La especificidad iónica de estas corrientes de salida se determinó mediante un análisis de las corrientes de cola (Fig. 1), en el que se obtuvo un potencial de reversión de -99 mV muy cercano al potencial de equilibrio teórico para el potasio ($E_K = -102$ mV; Fig. 2), indicando la selectividad por potasio de estos canales. El protocolo necesario para este análisis se realizó aplicando un pulso despolarizante de intensidad supraumbral a 30 mV (precedido de un prepulso para eliminar cualquier inactivación dependiente de voltaje) y, posteriormente, llevar el potencial de membrana desde 0 mV hasta -110 mV en saltos de 10 mV. Los datos de corriente, obtenidos en los primeros 4 ms de relajación de la corriente, se representaron frente al voltaje y el potencial de reversión de la corriente se obtuvo interpolando en la gráfica. El potencial de membrana de las células de glía envolvente registradas se fijó normalmente, en -60 mV para examinar las corrientes

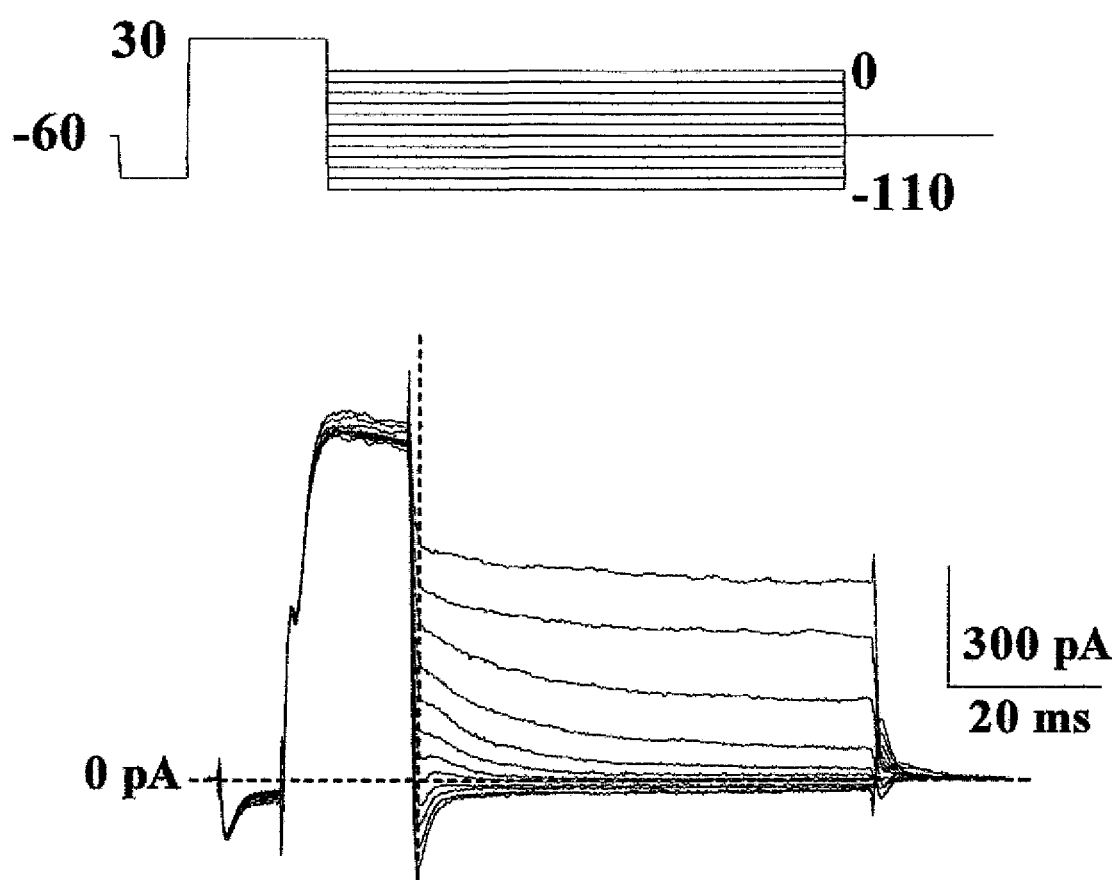
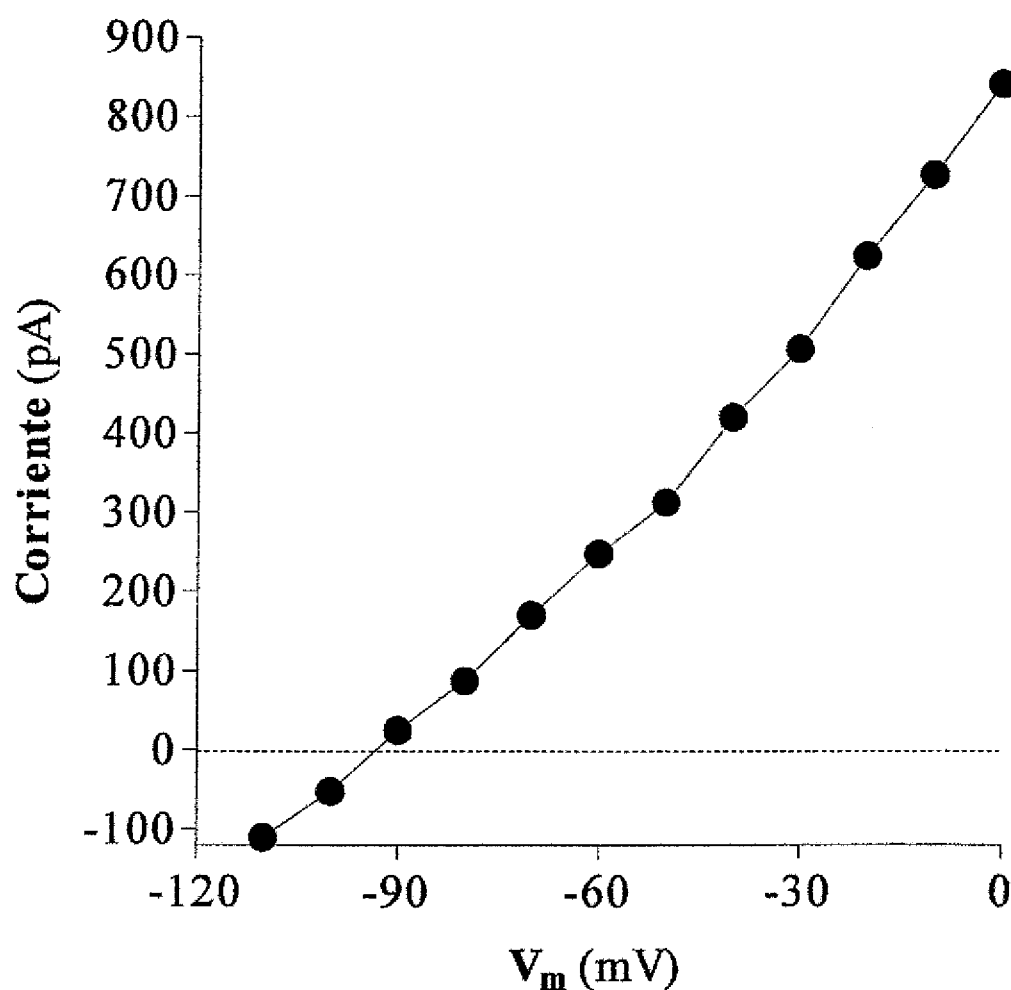


Figura 1

El potencial de reversión de la corriente de salida se determinó aplicando el protocolo representado en la parte superior de la figura. El potencial de membrana en el cual la corriente es nula es el potencial de reversión.

**Figura 2**

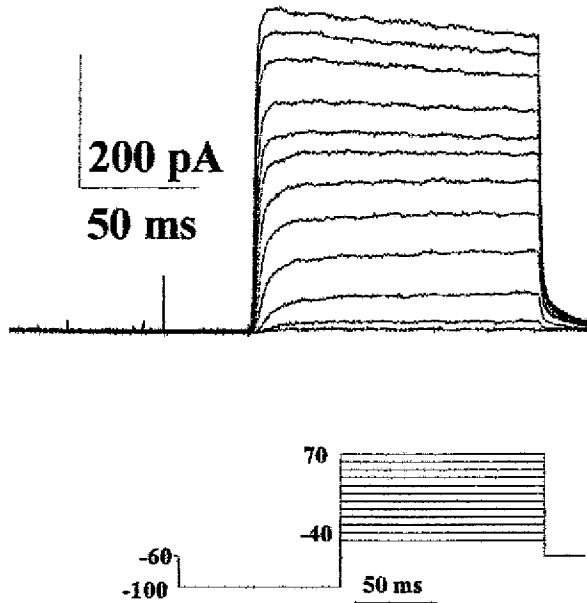
Representación gráfica de la corriente respecto al voltaje obtenida representando los valores de relajación de la corriente 2 ms después de finalizar el pulso de estimulación de 30 mV, aplicado a la célula de la figura 1. El potencial de reversión es igual a -99 mV, cercano al potencial de equilibrio para el potasio ($E_K = -101$ mV).

macroscópicas. Dichas corrientes se estudiaron aplicando una serie de pulsos despolarizantes a las células desde -50 mV hasta +60mV, en saltos de 10 mV, y un prepulso de -100 mV durante 100 ms, para eliminar cualquier inactivación dependiente de voltaje. Con este proceder, se pudieron observar tres tipos de corrientes de potasio que presentaron rectificación de salida. Dos de ellas se determinaron como pertenecientes a la familia de los rectificadores retardados y la otra se clasificó como una corriente transitoria o de tipo A.

Uno de los rectificadores retardados, (I_{KD1} ; Fig. 3A) se activó en potenciales de membrana mayores a -60 mV. Los datos obtenidos al final de cada pulso se convirtieron a valores promedio de conductancia que se normalizaron respecto a la conductancia máxima de cada registro. Después se representó gráficamente la conductancia normalizada respecto al potencial de membrana. Los datos representados se ajustaron a una función sigmoideal de Boltzmann obteniendo un valor promedio del $V_{1/2}$ para la activación en estado estacionario de -25.8 ± 2 mV ($n=3$; Fig. 4).

El otro tipo de rectificador retardado, que nombraremos como I_{KD2} (Fig. 3B), se activó al despolarizar la membrana de la glía envolvente por encima de los -50 mV. Los valores de conductancia normalizada se calcularon mediante el mismo procedimiento usado anteriormente. La gráfica que representa los valores de la conductancia normalizada frente al voltaje de membrana, permitió obtener un valor de $V_{1/2} = -9.2 \pm 1$ mV ($n=9$) para la activación en estado estacionario obtenida al ajustar los puntos de la curva a la función de Boltzmann (Fig. 4). El curso temporal de ambos rectificadores retardados fue similar, pero la constante de tiempo de la activación de la corriente en -10 mV de potencial de membrana fue significativamente más rápida para I_{KD1} (14 ± 3 ms; $n=6$), que para I_{KD2} (50 ± 11 ms; $n=5$); ANOVA con una $P=0.0021$.

A



B

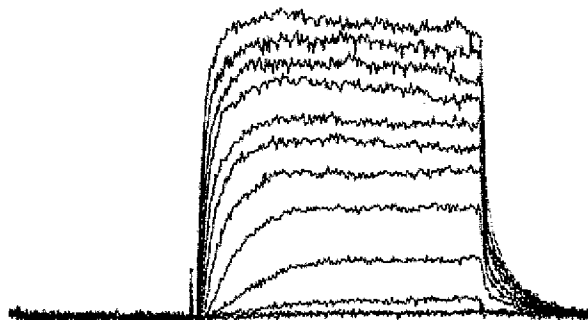


Figura 3

A: familia de trazos de corriente KD1, obtenida en una célula de glía envolvente mediante fijación de voltaje aplicando el protocolo del inserto. **B:** corriente KD2, obtenida en otra célula mediante el mismo protocolo.

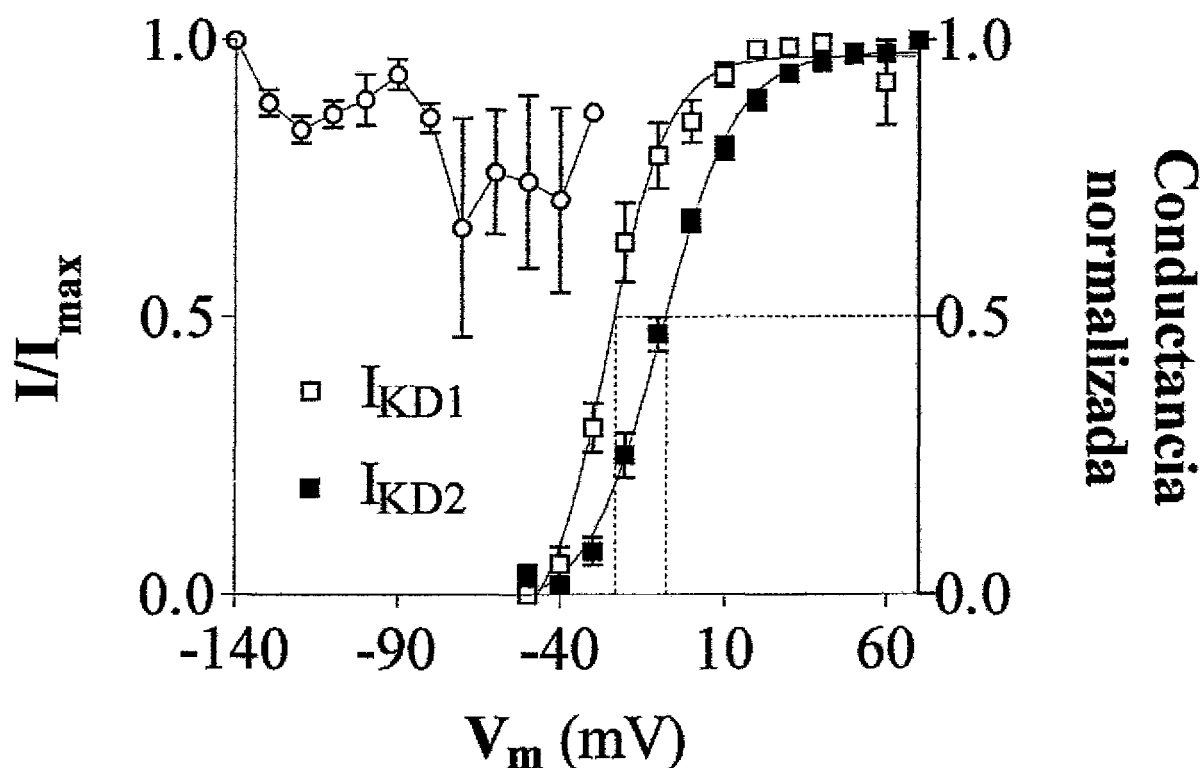


Figura 4

Curva conductancia -voltaje de los rectificadores retardados expresados en la glía envolvente (lado derecho de la gráfica), en la cual se han ajustado los datos obtenidos de conductancia normalizada promedio a una ecuación sigmoideal de Boltzmann, obteniendo una $V_{1/2} = -25.8 \pm 2$ mV ($n=3$) para I_{KD1} y de -9.2 ± 1 mV ($n=9$) para I_{KD2} . El lado izquierdo muestra los valores promedio normalizados respecto a la corriente máxima obtenidos aplicando una serie de prepulsos desde -140 mV hasta -30 mV, antes de activar de forma supraumbral ambas corrientes y representados frente al voltaje del prepulso. La gráfica muestra la ausencia de inactivación dependiente de voltaje.

Ambos tipos de rectificadores retardados no presentaron inactivación cuando se aplicó un protocolo, para analizar los parámetros de la inactivación, consistente en una serie de prepulsos desde -140 mV hasta -30 mV en saltos de 10 mV antes de activar la corriente aplicando un pulso de 60 mV (Fig. 4).

La corriente transitoria o de tipo A en las células de glía envolvente se encontró coexpresada con alguno de los dos tipos de rectificador retardado descritos anteriormente, o bien fue la única que se expresó. Se caracterizó por activarse rápidamente en potenciales mayores a -60 mV, alcanzó un pico 15 ± 2 ms al aplicar un pulso de 60 mV ($n=4$) después del comienzo del pulso de estimulación, tras lo cual la corriente se inactivó rápidamente y cayó a 0 pA (Fig. 5). Los valores del pico se normalizaron a conductancia y se promedió para obtener la curva conductancia-voltaje; el valor promedio de $V_{1/2}$ obtenido para la activación fue de -16 ± 2 mV ($n=4$; Fig. 6). La constante de tiempo de la activación a -10 mV fue de $5,6 \pm 0.001$ ($n=4$) ms. La curva de inactivación en estado estacionario se obtuvo aplicando el mismo protocolo de pulsos de voltaje que se usó para la corriente de tipo rectificador retardado, midiendo la corriente en cada uno de los picos obtenidos y normalizándolas respecto al valor máximo (Fig. 6), y el valor de $V_{1/2}$ para la inactivación en estado estacionario fue de -97 ± 2 ($n=4$) mV.

Las constantes de tiempo para la activación de las corrientes de potasio se obtuvieron ajustando los componentes dependientes del tiempo en cada registro a funciones monoexponenciales. Después, los valores promedio de las constantes de tiempo obtenidas se representaron respecto al potencial de membrana (Fig. 7). Mediante este procedimiento se observó que los valores de las constantes de tiempo de la activación de las corrientes de potasio, tanto de los dos tipos de rectificadores retardados como de la corriente transitoria,

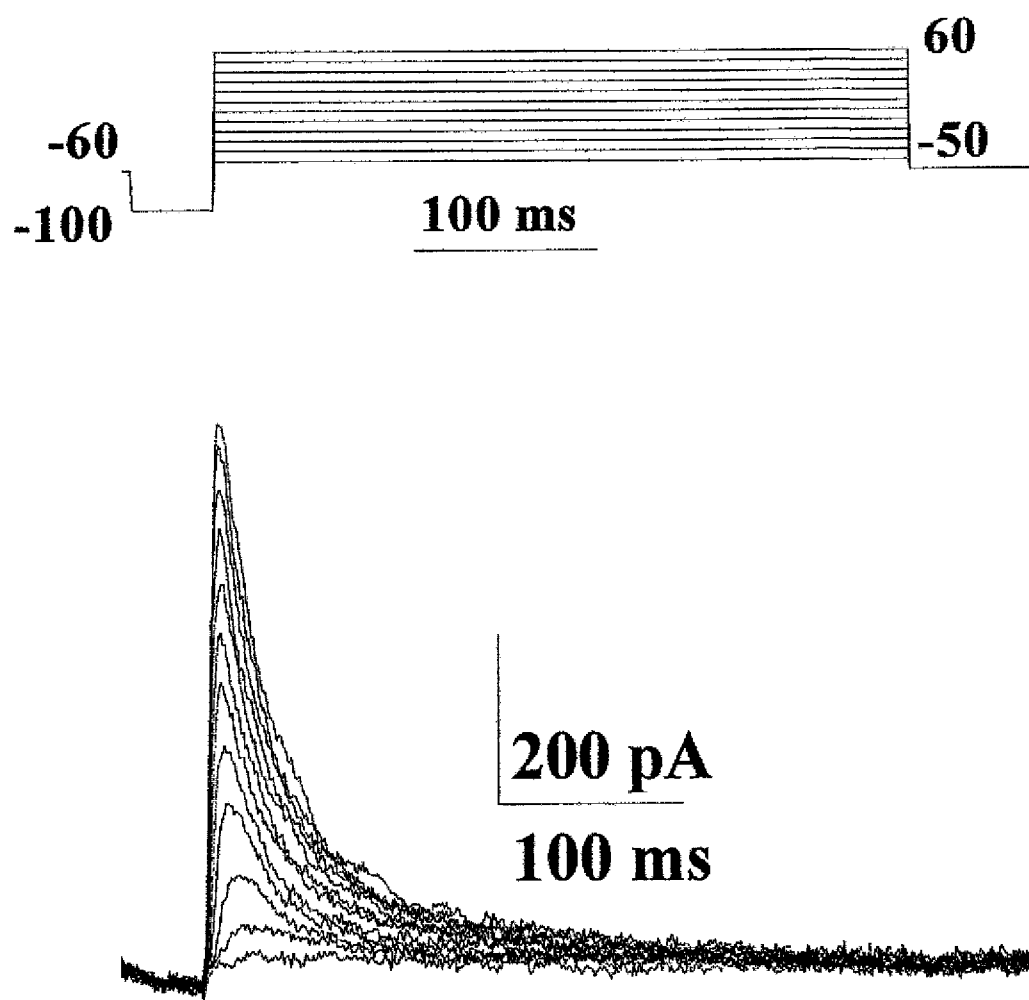


Figura 5

Corriente transitoria obtenida aplicando a la célula el protocolo de pulsos de voltaje despolarizantes mostrado en la parte superior de la figura.

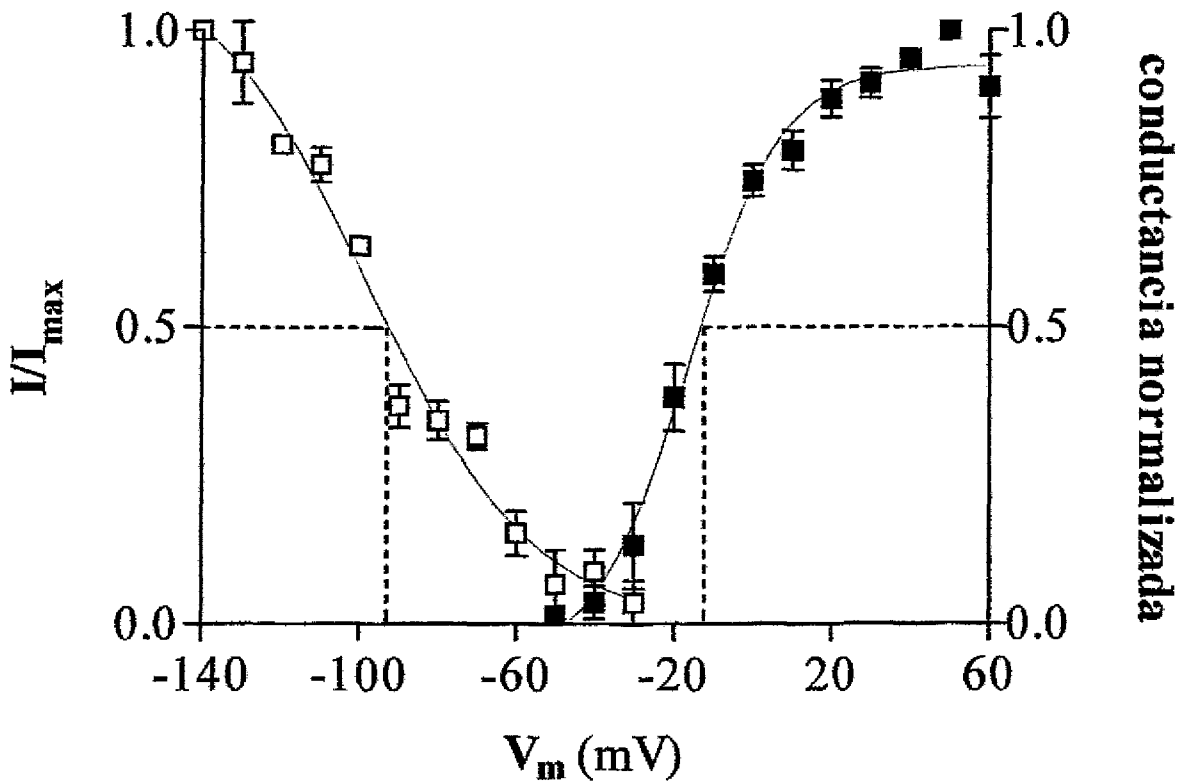
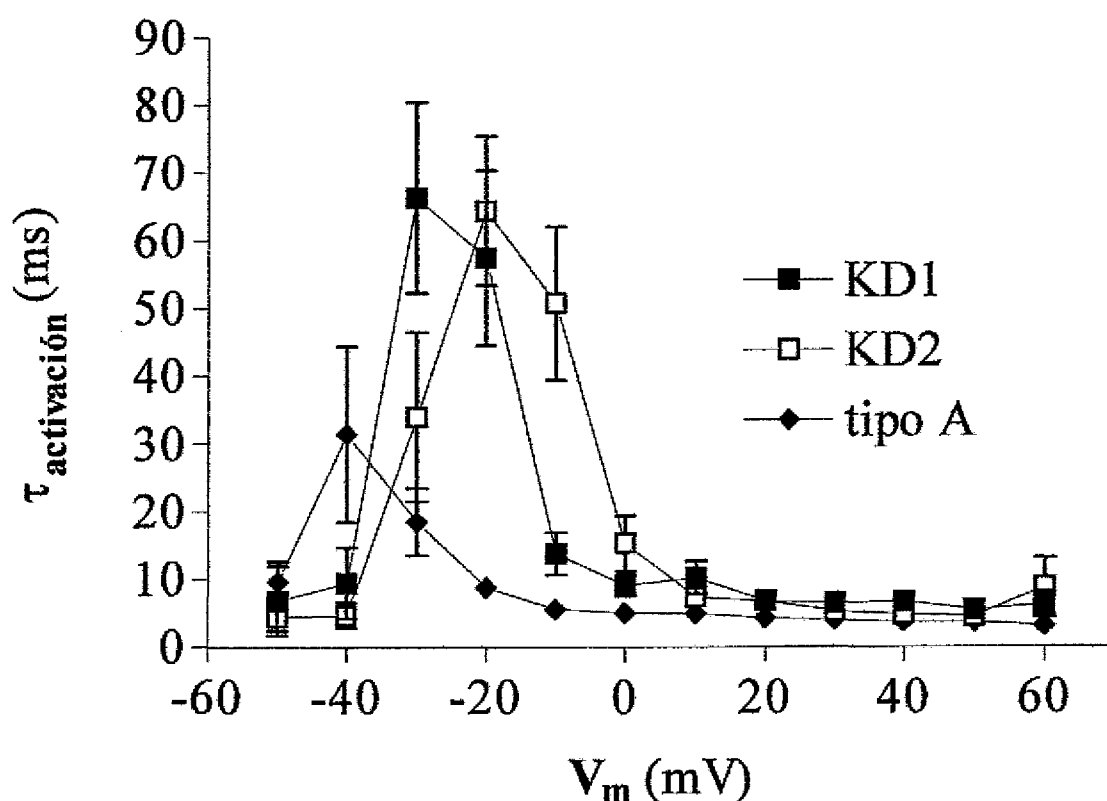
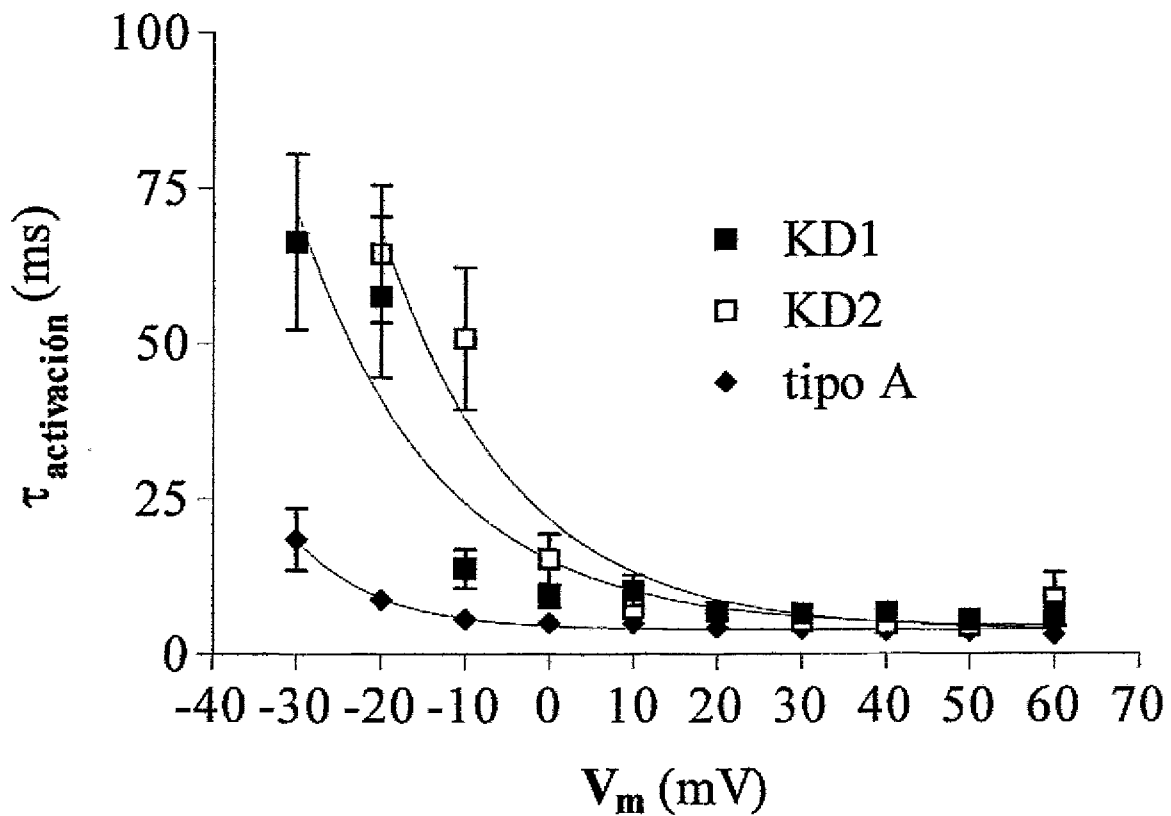


Figura 6

Curvas de activación e inactivación para la corriente transitoria. Los datos promedio normalizados que se muestran se han ajustado a ecuaciones de Boltzmann, por el mismo procedimiento que en la figura 4, tanto para la activación (lado derecho) como para la inactivación (lado izquierdo). La $V_{1/2}$ para la activación fue de -16 ± 2 mV ($n=4$) y para la inactivación fue de -97 ± 2 ($n=4$) mV.

**Figura 7**

Gráfica que representa las constantes de tiempo de la activación, que fueron obtenidas ajustando a curvas exponenciales cada uno de los componentes dependientes del tiempo, que se observaron en los trazos de las corrientes macrocópicas de potasio registradas. Después los datos de las constantes de tiempo (τ) se representaron respecto al voltaje de la membrana.

**Figura 8**

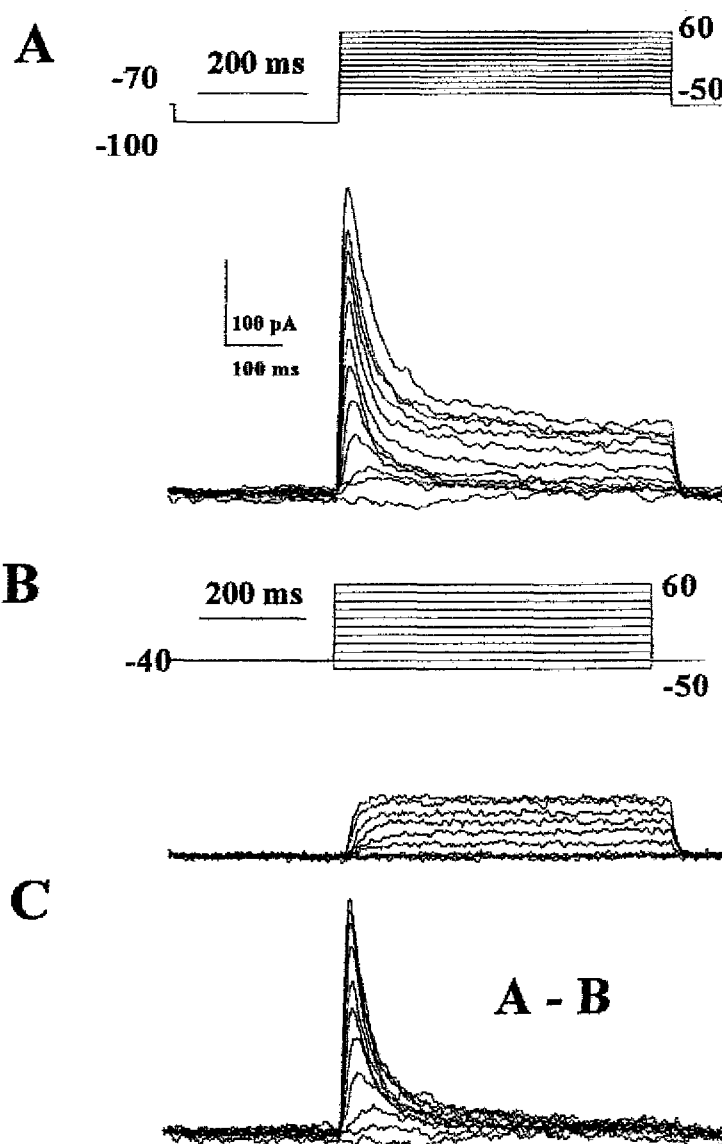
Gráfica que representa las constantes de tiempo de la activación, que fueron obtenidas ajustando cada uno de los componentes dependientes del tiempo de los trazos de las corrientes macrocópicas de potasio a curvas exponenciales. Después se representaron respecto al voltaje de membrana, pero a partir de -30 mV. Los promedios de las constantes de tiempo respecto al voltaje de cada tipo de corriente se ajustaron a una curva de caída exponencial.

eran dependientes del voltaje aplicado a la membrana. Los valores promedio de las constantes de tiempo disminuyeron de forma exponencial cuanto más se despolarizó el potencial de membrana (Fig. 8), esto equivale a decir que la activación se aceleró al despolarizar la membrana. La corriente de tipo A se caracterizó por su activación rápida, mientras que los rectificadores retardados fueron de cinética de activación más lenta. Estos últimos se pudieron diferenciar entre sí por el curso temporal de la activación, así el rectificador I_{KD1} se activó en valores de potencial de membrana más hiperpolarizados y más rápidamente que el tipo I_{KD2} .

Cuando la corriente transitoria se coexpresó con un rectificador retardado, ambas corrientes se pudieron separar mediante protocolos de sustracción, que consistieron en la aplicación de un primer protocolo de pulsos de estimulación con un prepulso a -100 mV que eliminó la inactivación dependiente de voltaje. Posteriormente, a la familia de trazos obtenida se le sustrajo otra serie de trazos de corriente obtenidos al estimular la misma célula, pero sin el prepulso a -100 mV, con lo cual la corriente transitoria se inactivó y no apareció en el registro. El resultado de la sustracción fue la corriente transitoria aislada (Fig. 9).

Los dos tipos de rectificadores retardados eran más sensibles a 5 mM de 4-AP que a 10 mM de TEA extracelulares. El primer bloqueante eliminó toda o casi toda la corriente que pasó a través de la membrana, mientras que TEA bloqueó el 10% o menos de la corriente total. La corriente transitoria se bloqueó totalmente con 4-AP a la concentración usada (Fig. 10).

Las células registradas se estimularon habitualmente con pulsos de voltaje hiperpolarizantes respecto al potencial de reposo de la glía envolvente encontrándose, en ocasiones, una corriente de entrada que coexistió con las descritas antes. Esta corriente era similar a la corriente de potasio rectificadora de entrada o anómalo (Fig. 11). Pero, este tipo

**Figura 9**

Aislamiento de la corriente transitoria (corriente tipo A) por sustracción del rectificador retardado: primero (A) se aplicó un protocolo depolarizante con un prepulso a -100 para eliminar la inactivación dependiente de voltaje. Después se aplicó el mismo protocolo pero sin el prepulso (B). Posteriormente se sustrajeron digitalmente ambas familias de corriente para obtener la corriente transitoria pura (C).

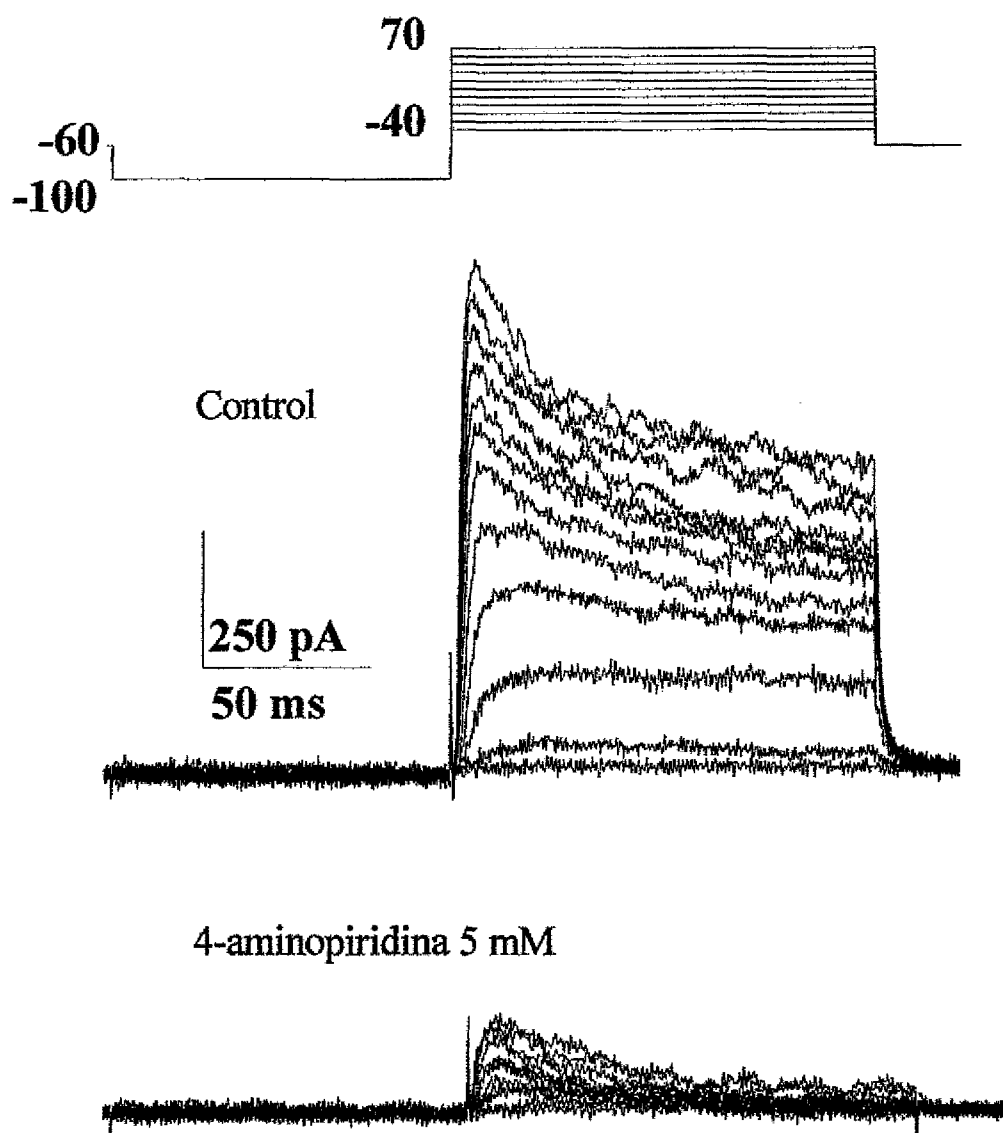


Figura 10

Sensibilidad de la corriente de salida a 4-aminopiridina 5 mM que fue añadida al medio extracelular de una célula mediante un sistema de perfusión.

de rectificador de entrada se caracterizó por su activación lenta a partir de potenciales más negativos a -70 mV. La gráfica corriente-voltaje para esta corriente se obtuvo representando el valor promedio de corriente obtenido en los últimos 4 ms del pulso de estimulación respecto al voltaje de membrana (Fig. 12), y la nombraremos como I_{tr} . El examen de colas (Fig. 13) indicó que la corriente invierte su signo en -70 mV, lejos del potencial de reversión del potasio, con lo cual no quedó claro cuál era el ion o iones que son portadores de la corriente (Fig. 14).

4.2.- Corrientes macroscópicas de Calcio y de Cloro operadas por voltaje

La glía envolvente también se registró en condiciones de bloqueo de las corrientes de potasio para examinar la presencia de corrientes de calcio y de cloro (0 potasio, 10 mM bario extracelular/ 0 potasio, 120 mM cesio).

Las células se fijaron en un potencial de membrana de -80 mV y este se varió desde -50 mV hasta $+60$ mV en saltos de 10 mV durante 250 ms. En algunas células se obtuvo una corriente de entrada (Fig. 15) de umbral aparente de activación de -40 mV, que no presentó inactivación y en 0 mV alcanzó un máximo de entrada de corriente (Fig. 16). Esta corriente se bloqueó totalmente cuando se añadió 1 mM de Cl_2Cd a la solución extracelular. Todos estos datos, en conjunto, concuerdan con las propiedades esperadas de una corriente de calcio operada por voltaje de alto umbral de activación.

Otras células de glía envolvente, a las que se les aplicó este mismo protocolo, tuvieron un voltaje aparente de reversión de la corriente alrededor de -45 mV, debido probablemente a una corriente de cloro que se coexpresó en esas células. Una parte de las células registradas expresó esta corriente sin contaminarse con la corriente de calcio (Fig. 17),

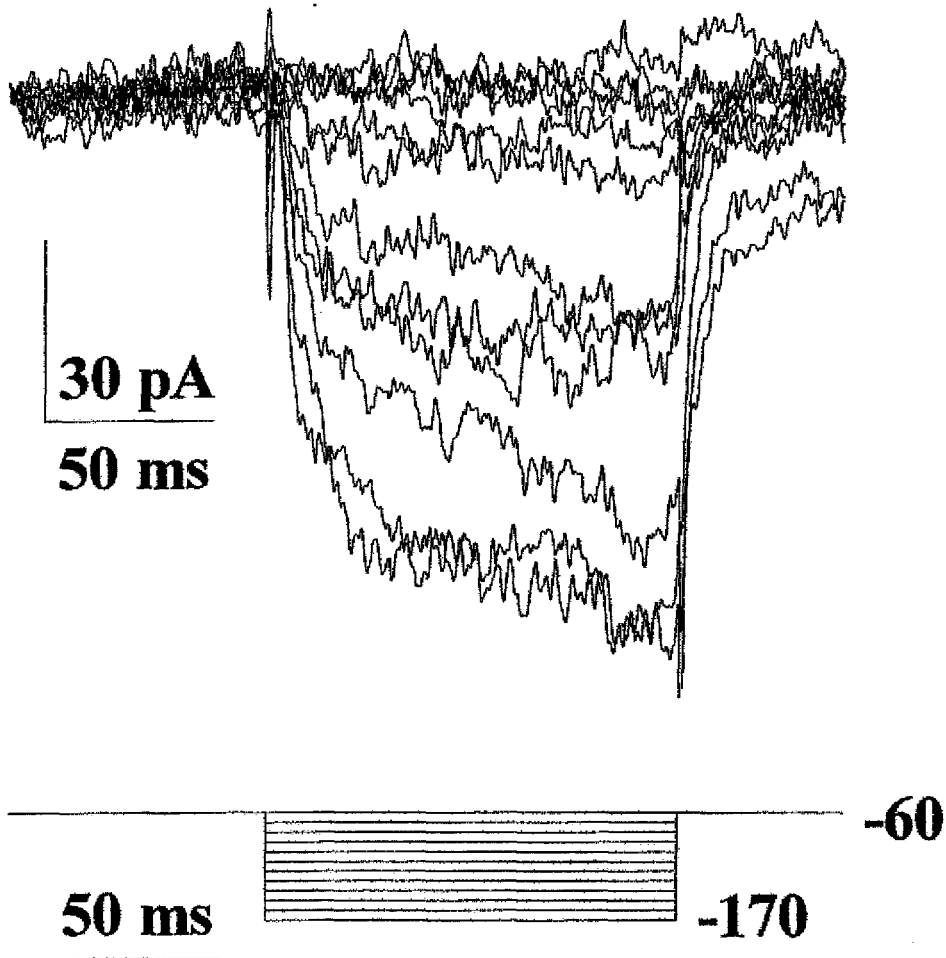
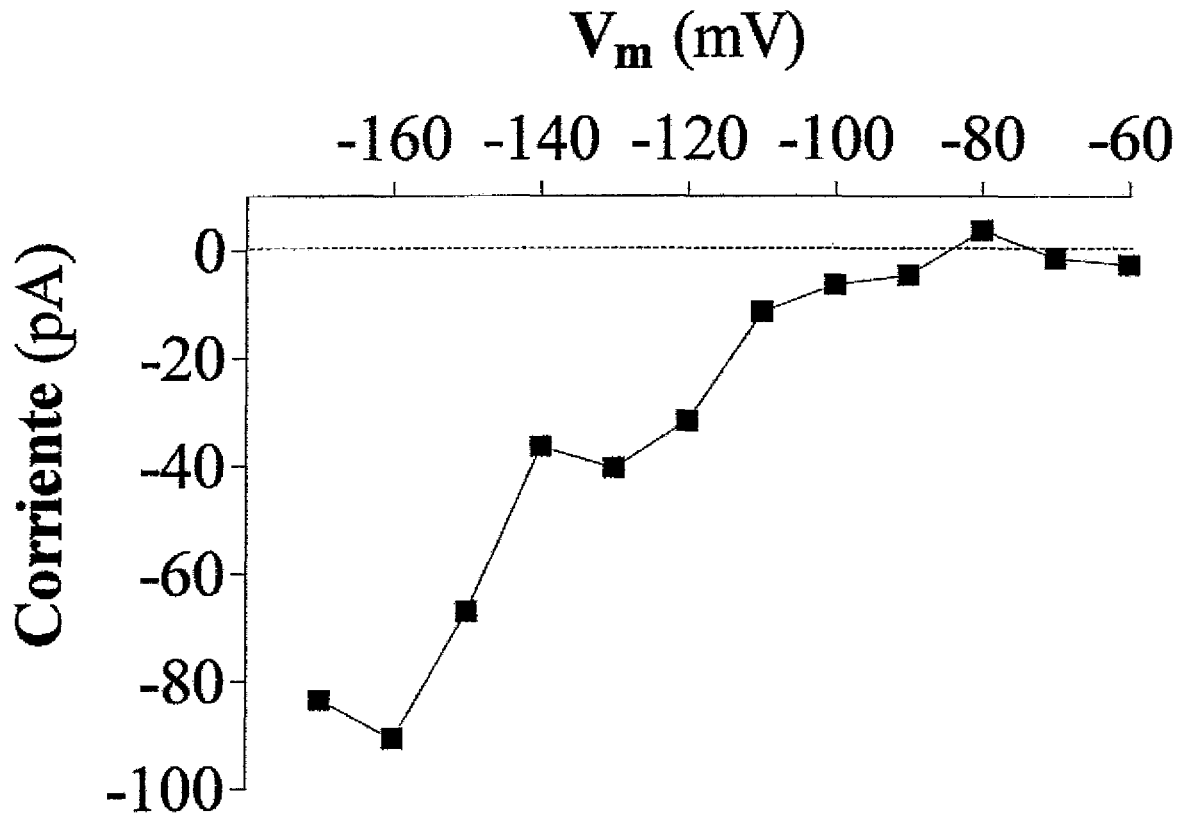


Figura 11

Familia de trazos de la corriente tipo rectificador de entrada de una célula, que se obtuvieron aplicando el protocolo de pulsos de voltaje mostrado en la parte inferior de la figura.

**Figura 12**

Representación gráfica de la corriente frente al voltaje de la membrana para el rectificador de entrada. Los valores se obtuvieron representando el promedio de la corriente en los últimos cuatro ms del pulso de estimulación.

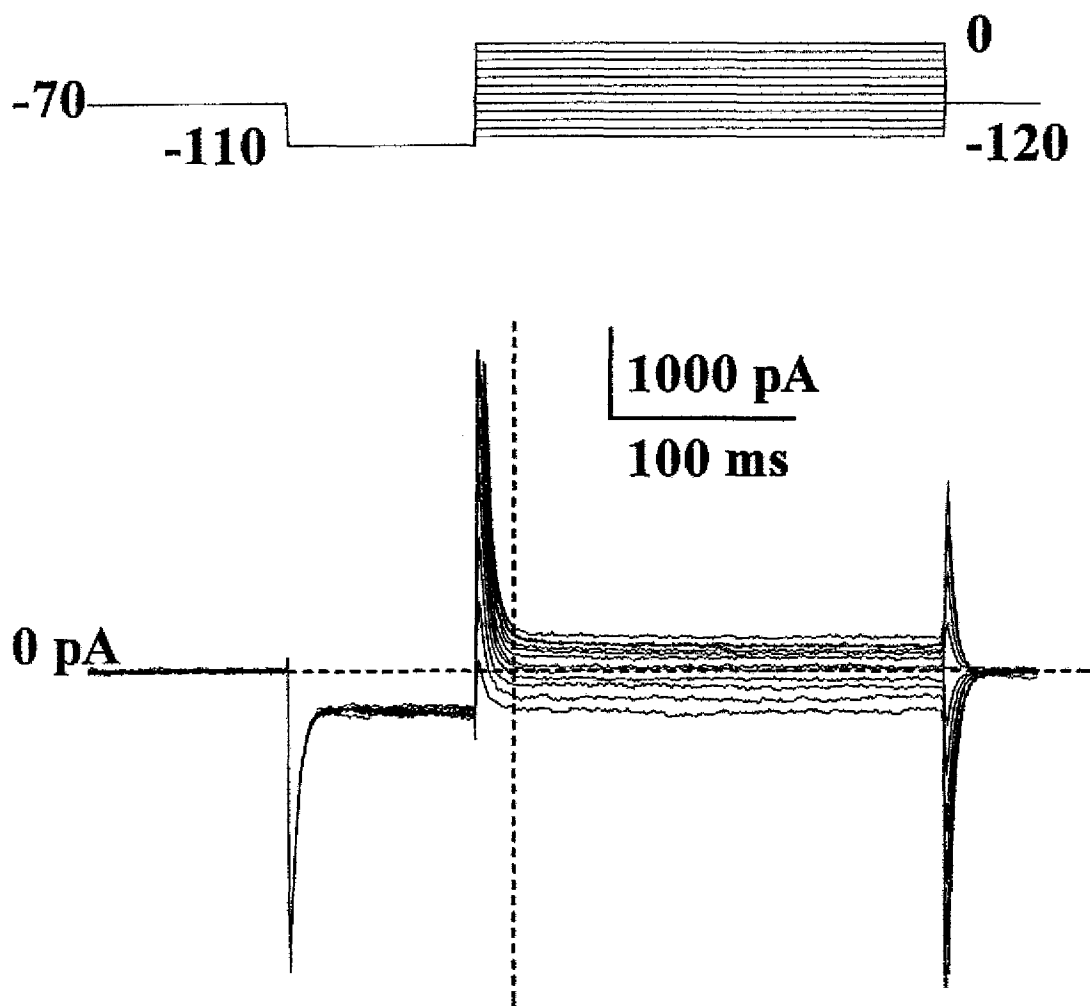


Figura 13

La selectividad iónica de la corriente de entrada se determinó mediante un análisis de colas como el realizado en la figura 1. Trazos de corriente obtenidos mediante el protocolo mostrado, la línea de puntos horizontal indican el nivel de corriente nula y la vertical el punto donde se toman los datos.

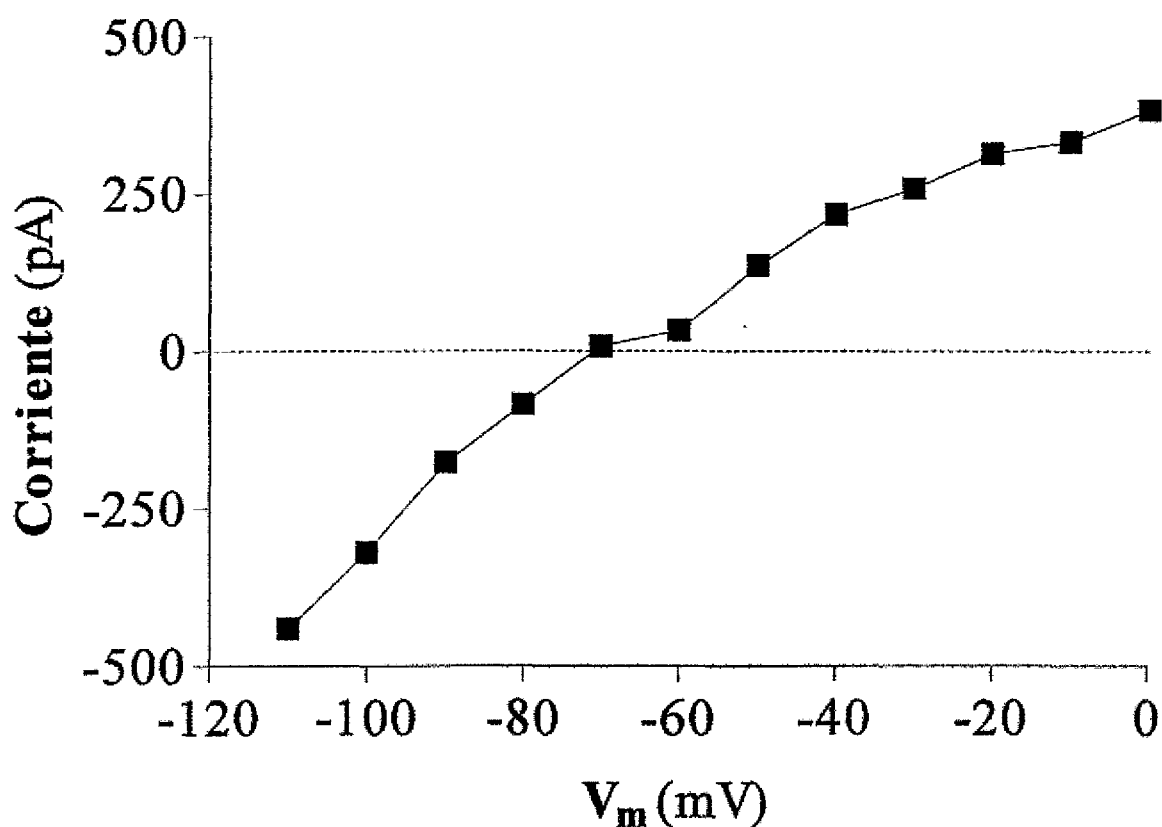
**Figura 14**

Gráfico que representa la corriente obtenida 4 ms después del pulso de estimulación (línea discontinua vertical en la figura 13) respecto al voltaje aplicado después del pulso de estimulación de -120 mV. La corriente cambia de signo en -70 mV.

lo que permitió su estudio. Esta corriente se caracterizó por presentar rectificación de salida, activándose en potenciales más positivos de -50 mV y no presentó inactivación (Fig. 18). El análisis de colas de esta corriente (Fig. 19) dio como resultado un potencial de reversión de -2.83 mV ($E_{Cl} = -2.81$ mV; Fig. 20), indicando que los canales que subyacen a esta corriente eran selectivos a iones cloruro.

4.3.- Estudio morfológico: subpoblaciones y acoplamiento entre células de la glía envolvente

La glía envolvente en cultivo primario no era una población homogénea; se observó la existencia de dos tipos morfológicos: células con morfología multipolar y las células de morfología bipolar. La glía envolvente de morfología multipolar posee entre tres y seis prolongaciones muy finas que salen del soma en forma radial. Las células bipolares tienen forma de huso y sus dos prolongaciones largas y finas salen de los extremos del eje mayor de la célula. Ambos tipos celulares se inyectaron mediante una micropipeta rellena con Amarillo Lucifer (1 mg/ml) disuelto en la solución intracelular habitual (con alta [potasio]), al mismo tiempo que se registraban. Las células de la cámara de registro se vieron bajo el microscopio de fluorescencia, donde se observó el soma y los delgados procesos que salían de éste. En estas condiciones nunca se vio acoplamiento entre las células de glía envolvente, ni éstas se acoplaban con otros tipos celulares presentes en el cultivo primario (Fig. 21, 22).

Desde el punto de vista de la electrofisiología, ambos tipos morfológicos se comportaron igual y se consideraron equivalentes, tanto para las corrientes de potasio como para las de calcio y las de cloro.

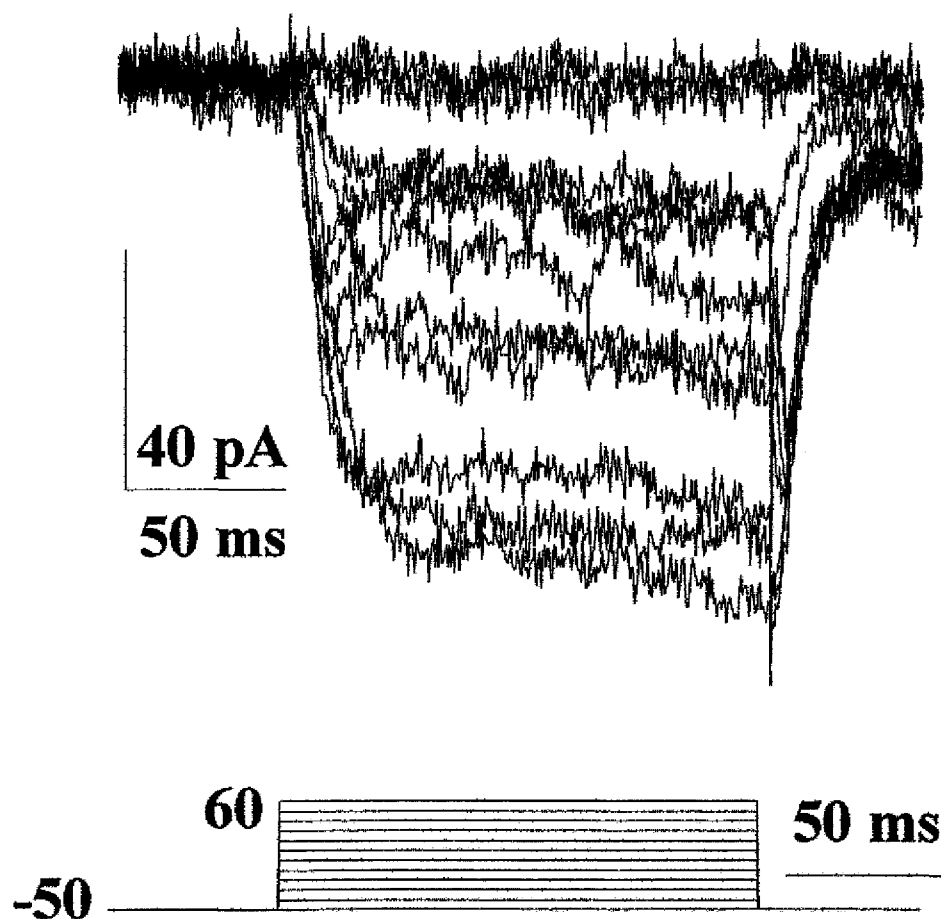
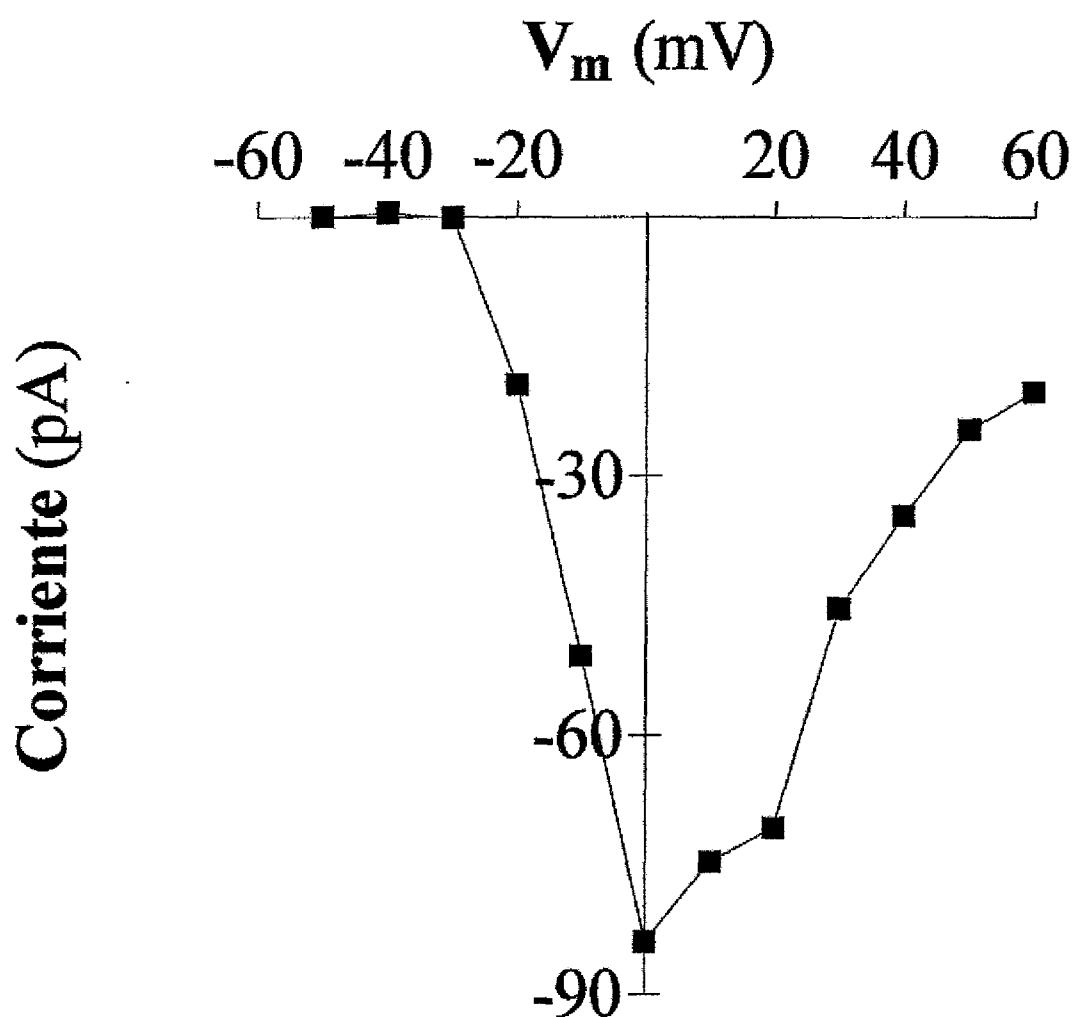


Figura 15

Corrientes de calcio obtenidas aplicando la familia de pulsos despolarizantes mostrado, a una célula bañada en una solución extracelular con cloruro de bario y libre de iones potasio.

**Figura 16**

La representación gráfica corriente respecto al voltaje de membrana se obtuvo representando el valor promedio de la corriente en estado estacionario. Este valor se calculó promediando la corriente en los últimos cuatro ms de cada pulso de estimulación aplicado en la figura 15. Después, los datos se representaron respecto al voltaje de la membrana.

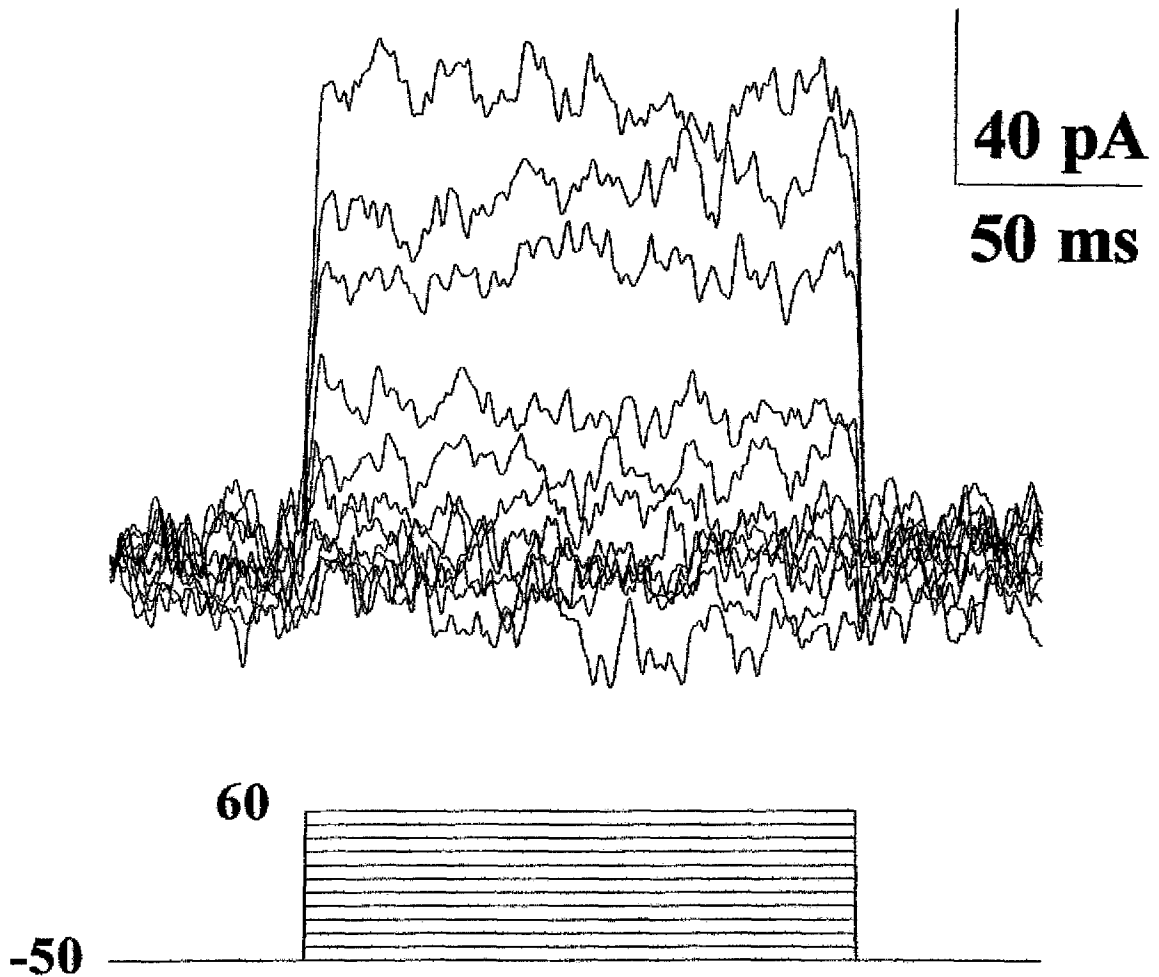
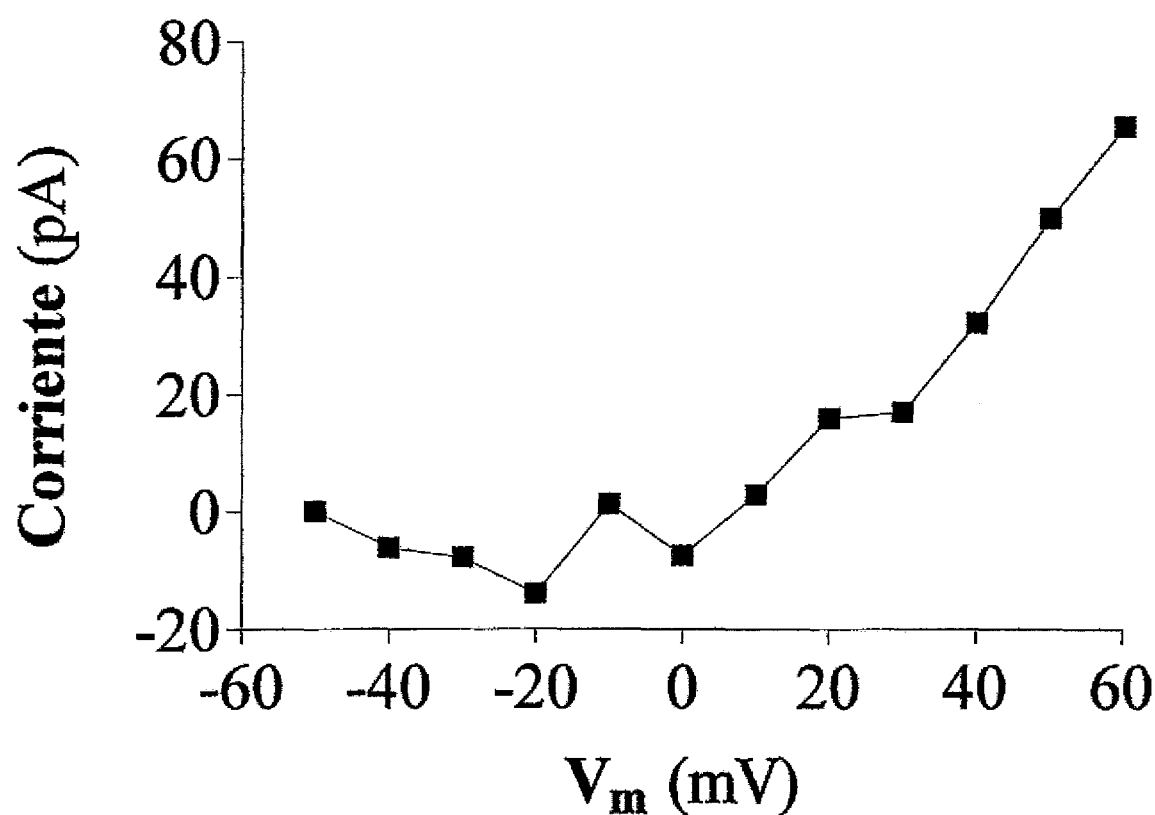
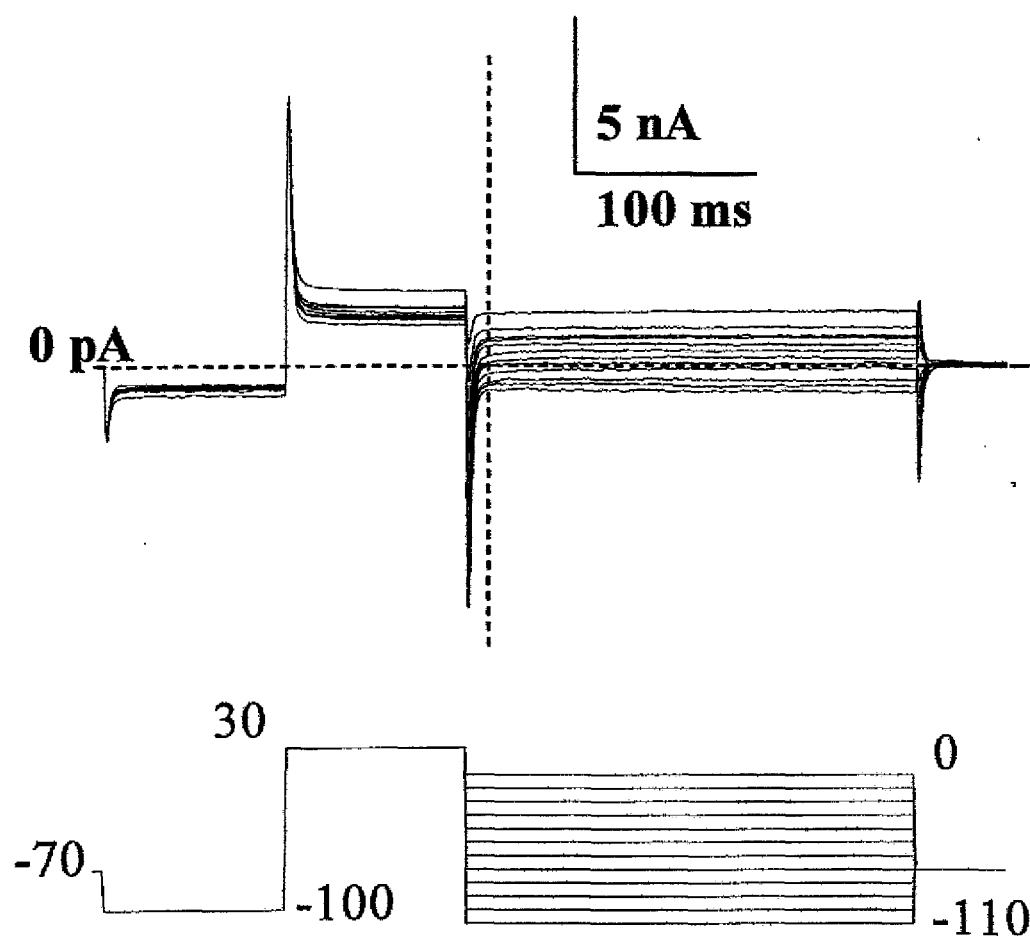


Figura 17

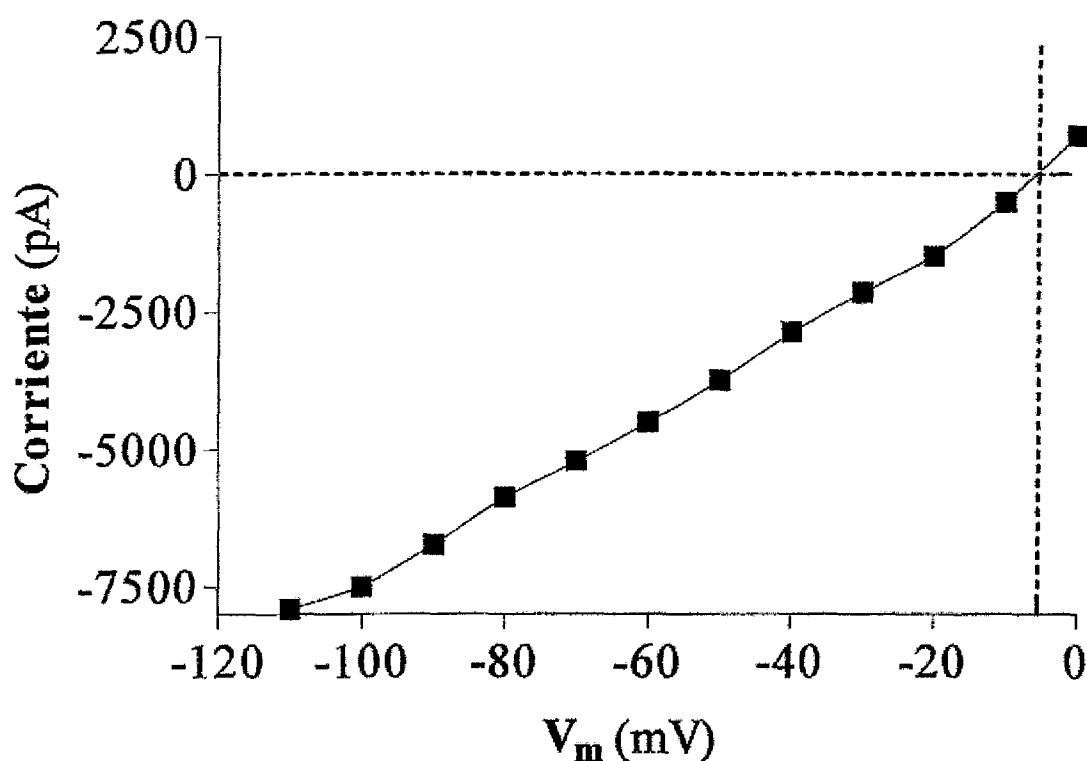
Trazos de corriente de cloro obtenida con soluciones de registro libres de potasio y aplicando pulsos despolarizantes, como se muestra en el protocolo de la parte inferior.

**Figura 18**

Representación gráfica de la corriente promedio respecto al potencial de membrana, obtenida en los cuatro últimos ms de cada pulso de voltaje. Los datos de corriente se extrajeron de la célula de la figura 17.

**Figura 19**

Familia de trazos de corrientes obtenidas mediante el protocolo representado en la parte inferior de la figura que se usó para determinar la selectividad iónica de la corriente de salida en solución extracelular libre de potasio.

**Figura 20**

Representación gráfica de la corriente respecto al voltaje, obtenida representando los valores de relajación de la corriente 2 ms después de finalizar el pulso de estimulación a 30 mV (línea vertical). El potencial de reversión es igual a -2,83 mV, valor muy parecido al potencial de equilibrio para el ion cloruro ($E_{Cl} = -2,81$ mV).

4.4.- Evolución temporal de las corrientes macroscópicas de potasio

La glía envolvente coexpresó una serie de combinaciones de canales iónicos dependientes de voltaje y encontramos cuatro fenotipos para las corrientes de potasio y otros cuatro para las de calcio y cloro. Estos caracteres cambiaron con el tiempo en cultivo independientemente de la morfología.

Los registros obtenidos permitieron agrupar a las células muestreadas en cuatro grupos de fenotipos según las corrientes macroscópicas de potasio expresadas en cada célula: i) células que expresaron únicamente la corriente de tipo rectificador retardado, ii) células que mostraron la corriente transitoria, iii) células expresaron ambos tipos y, finalmente, iv) células que poseían la corriente de tipo rectificador de entrada, coexpresada con alguna de las combinaciones anteriores. Las células muestreadas se incluyeron dentro de una tabla de contingencia 3x4, donde las columnas indicaron el fenotipo (conjunto de corrientes que expresó) y las filas el intervalo de días en cultivo (χ^2 con 6 grados de libertad, $P=0.02$), indicando que el número de células con un determinado fenotipo electrofisiológico no se distribuyó al azar, sino que cambió con la edad del cultivo. La proporción de cada fenotipo varió con el tiempo en cultivo: aumentó la cantidad de células en la población que coexpresó el rectificador retardado y la corriente transitoria y disminuyó el número de células con otros fenotipos electrofisiológicos (Fig. 23). Estos cambios no implicaron expresión de nuevos canales, como indicó el análisis de regresión entre la densidad de corriente de potasio y el tiempo en cultivo (Fig. 24; $r=0.42$, $n=37$).

4.5.- Evolución temporal de las corrientes macroscópicas de calcio y cloro

La glía envolvente, cuando se registró en condiciones bloqueantes de corrientes de

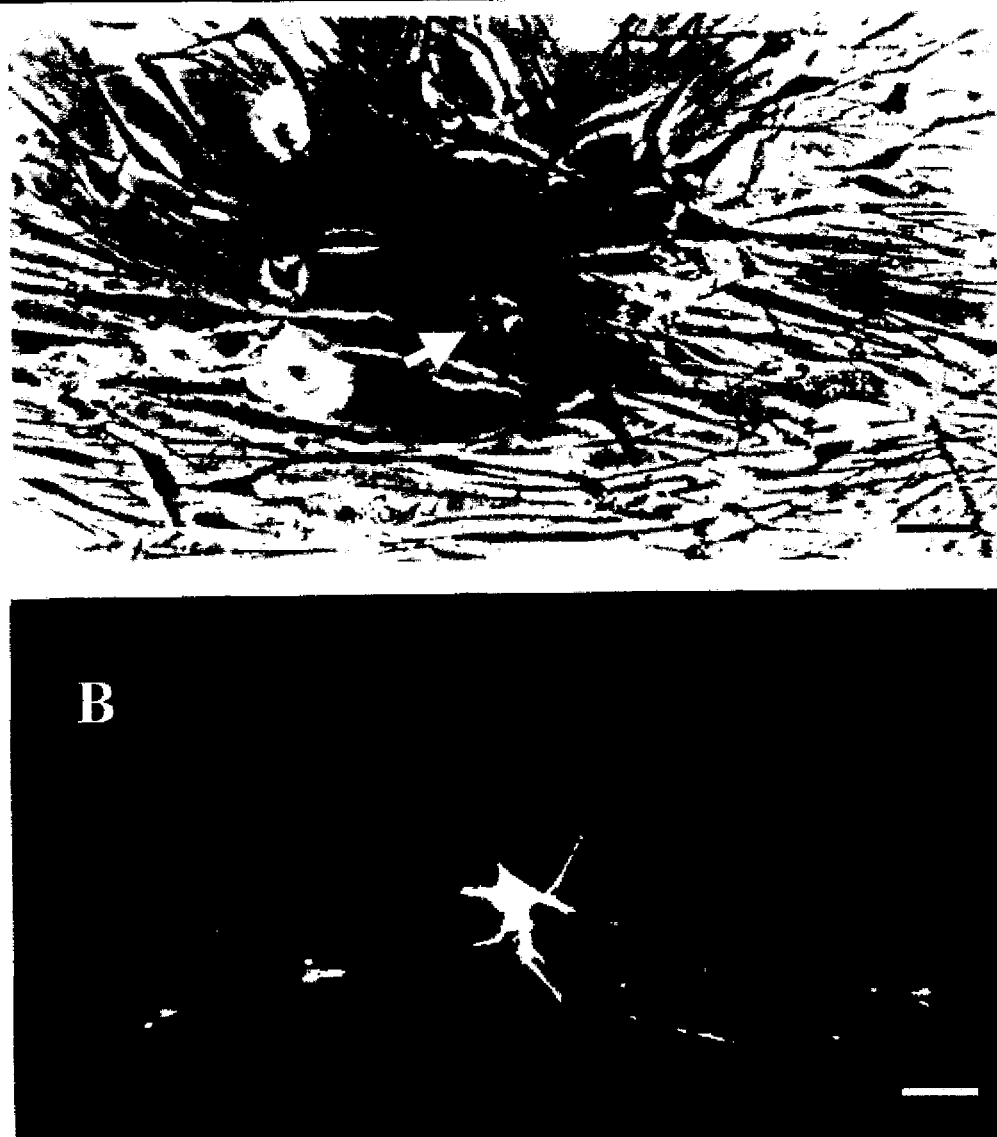
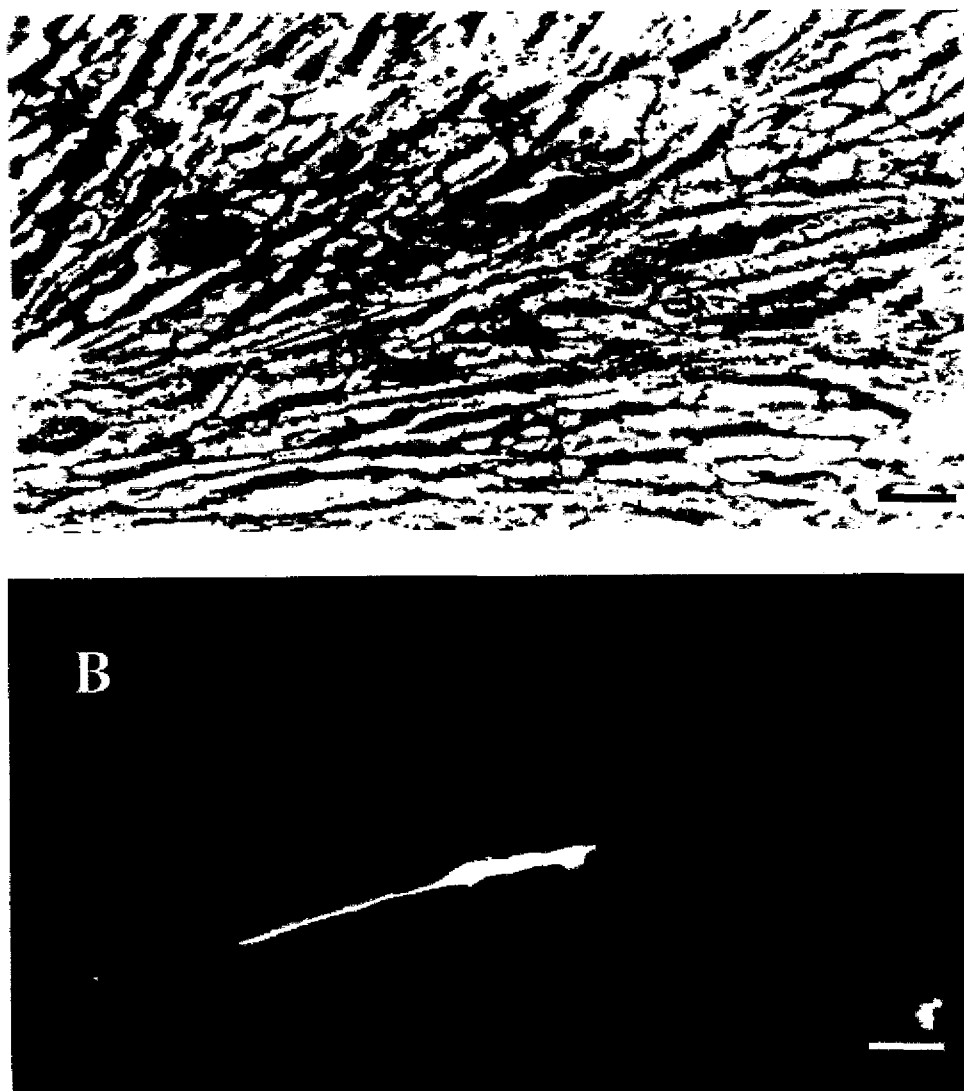


Figura 21

Estudio morfológico de una célula de glía envolvente multipolar de 18 días *in vitro* en cultivo casi confluyente, en la que no se observó acoplamiento con otras células de glía envolvente ni con otros tipos celulares presentes en él. A: contraste de fase B: imagen de fluorescencia . Barras de calibración: 50 μm en A y 30 μm en B.

**Figura 22**

Estudio morfológico de una célula bipolar en cultivo primario en un cultivo de 18 días *in vitro*. La célula (cabeza de flecha) se inyectó con Amarillo Lucifer disuelto en la solución intracelular y no se pudo observar acoplamiento con las células adyacentes. A: contraste de fase. B: microfotografía de fluorescencia. Barras de calibración: 50 μm en A y 30 μm en B.

potasio (bario extracelular/ cesio intracelular/ 0 potasio), se comportó como una población heterogénea. En ella se pudieron encontrar cuatro fenotipos: i) células que expresaron la corriente de calcio, bien ii) la de cloro, iii) células que coexpresaron ambas y, por último, iv) células que no expresaban ninguna de las dos ni se pudo detectar ningún otro tipo de corriente. Así mismo, estos fenotipos cambiaron con el tiempo en cultivo (se obtuvo una $P=0.007$ para la χ^2 con 6 grados de libertad).

La proporción de células, que coexpresaban la corriente de cloro y la de calcio, o sólo la de cloro, aumentó con el tiempo en cultivo, mientras que el número de células que expresaron la corriente de calcio disminuyó (Fig. 25). Así mismo ni la densidad de corriente de calcio ni la de cloro cambió con la edad del cultivo (Fig. 26; $r=0.46$, $n=19$).

4.6.- Comparación de las propiedades electrofisiológicas de la glía envolvente en cultivo primario y las inmunopurificadas magnéticamente

La glía envolvente se purificó en nuestro laboratorio para realizar trasplantes en áreas del SNC lesionado, en las cuales la glía envolvente es capaz de permitir la regeneración, como ya dijimos en la introducción. Además, se planteó la cuestión de si la glía envolvente purificada mantenía intactas sus propiedades electrofisiológicas, comparado con las células en cultivo primario.

El potencial de membrana en reposo obtenido en condiciones de fijación de corriente fue de -35 ± 3 mV ($n=8$), pero no fue significativamente distinto del obtenido en cultivo primario en células de glía envolvente de 6-15 días *in vitro* ($P=0.3246$, ANOVA de una vía).

La distribución de los distintos fenotipos tanto para las corrientes macroscópicas de potasio como para las de calcio y cloro, tampoco varió significativamente respecto a las células de glía envolvente en cultivo primario con edades comprendidas en el periodo entre

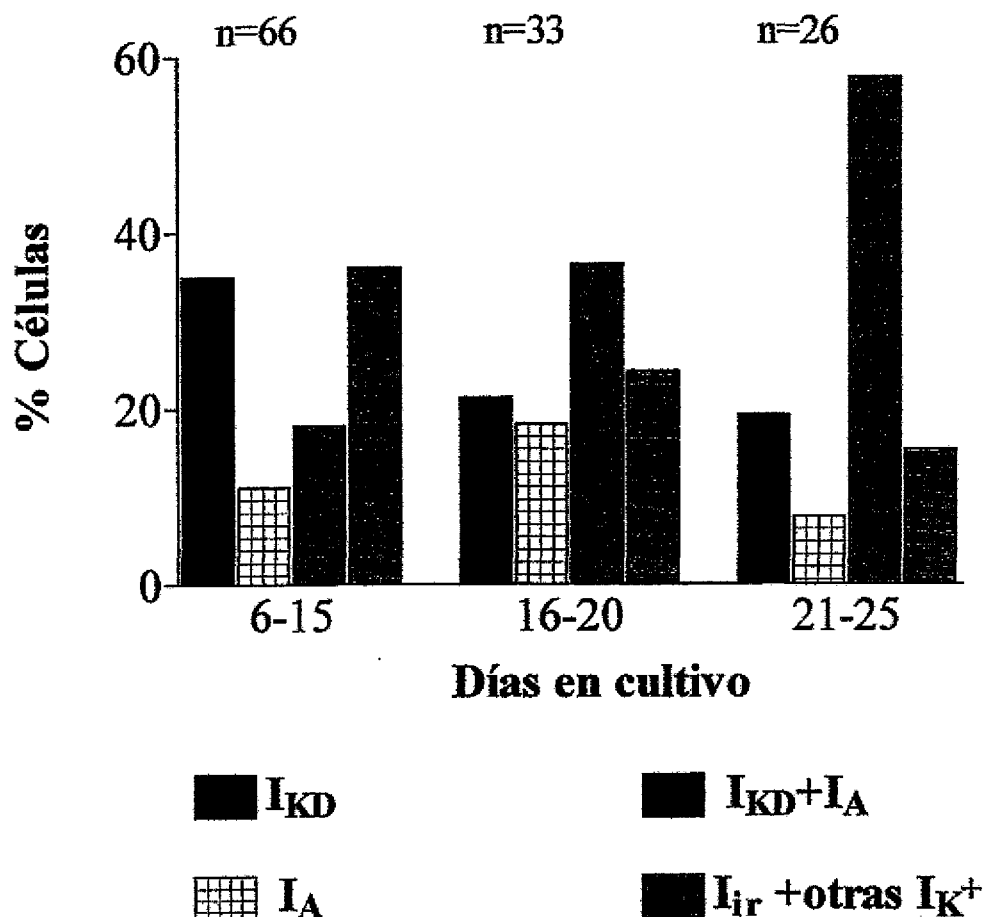


Figura 23

Evolución temporal de los fenotipos de la glía envolvente desde el punto de vista electrofisiológico. La barra I_{KD} representa el % de células que muestran únicamente el rectificador retardado, I_A es el % de las células que muestran la corriente transitoria, $I_{KD}+I_A$ es el % de la población del cultivo que muestra los dos tipos de corriente de potasio mencionadas anteriormente y, finalmente, la barra $I_{ir} + otras I_K^+$ se corresponde con el porcentaje de células que muestran la corriente rectificadora de entrada coexpresada con alguna/as de las corrientes de salida de potasio citadas anteriormente.

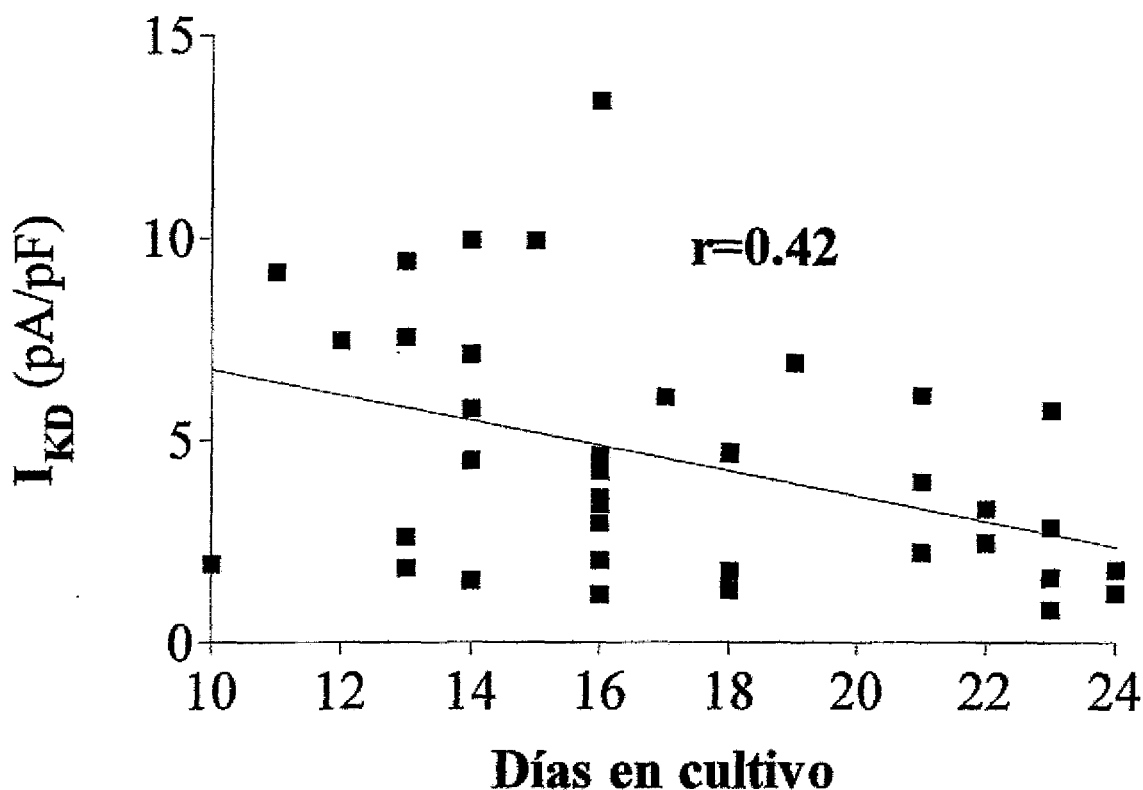
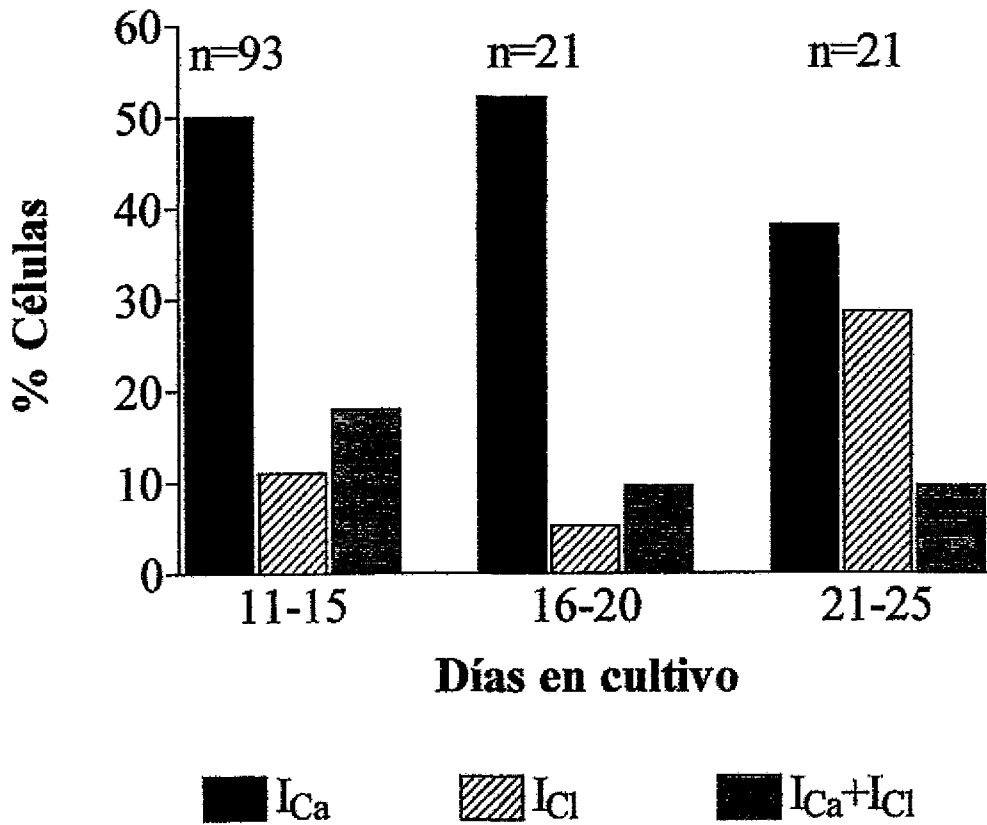


Figura 24

Evolución temporal de la densidad de la corriente de potasio de tipo rectificador retardado en la glía envolvente. Se realizó un análisis de correlación entre la densidad de corriente y la edad del cultivo. El coeficiente de correlación (r) se muestra en la figura.

**Figura 25**

Evolución temporal de los fenotipos para las corrientes macroscópicas de calcio y de cloro de la glía envolvente. I_{Ca} es el % de células que expresan la corriente de calcio, I_{Cl} es el % que expresa la corriente de cloro con rectificación de salida y $I_{Ca}+I_{Cl}$ representa el porcentaje de células que coexpresan ambos tipos de corriente.

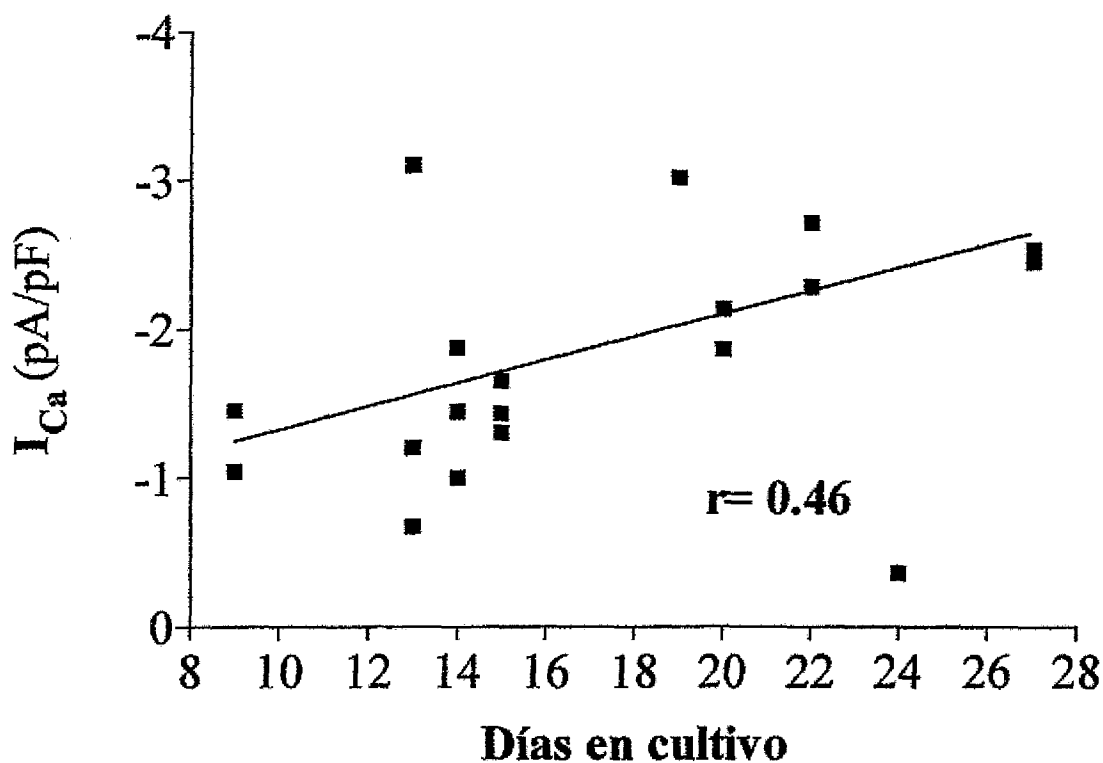


Figura 26

Evolución de la densidad de corriente de calcio con la edad del cultivo primario. Se realizó un análisis de correlación entre la densidad de corriente y la edad del cultivo. El coeficiente de correlación (r) se muestra en la figura.

los seis y los quince días *in vitro*, tanto para los fenotipos para las corrientes de potasio ($P=0.719$, para una χ^2 con 3 grados de libertad), como para la distribución fenotípica de las corrientes de calcio y cloro ($P=0.173$, para la χ^2 con 2 grados de libertad).

La glía envolvente purificada se trató con membranas de axones olfatorios, extraídas de las capas glomerular y de los nervios olfatorios durante más de 48 horas, para examinar cambios en la población de glía envolvente de morfología multipolar y en la bipolar. No se observaron cambios en la proporción de células bipolares respecto a las multipolares, entre las células sin tratar y tratadas 24 y 48 horas, respectivamente (ANOVA de una vía, $P>0,1$, $n=177$ y 161 , respectivamente).

4.7.- Efecto de fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios sobre las corrientes de potasio dependientes de voltaje de la glía envolvente

La glía envolvente de 6-15 días en cultivo se trató con las membranas obtenidas del bulbo olfatorio 24 y 48 horas, respectivamente; tras esto se realizaron los registros con las soluciones y protocolos adecuados para corrientes de potasio. Los parámetros estudiados fueron tres: i) cambios en las proporciones de los distintos fenotipos, ii) cambios en el potencial de reposo y, por último, iii) posibles cambios en la densidad de corriente, de alguna de las corrientes macroscópicas estudiadas anteriormente.

La distribución de los fenotipos de las células tratadas 24 horas no fue significativamente distinto de los de los controles ($P=0.2235$, para una χ^2 con 3 grados de libertad, $n=15$; Fig. 27). El potencial de reposo en las células tratadas fue de -43 ± 3 mV ($n=6$), valor no significativo respecto al control (ANOVA de una vía, $P=0.061$). Las densidades de corriente no diferían entre el grupo de tratados y controles, en el caso de las corrientes

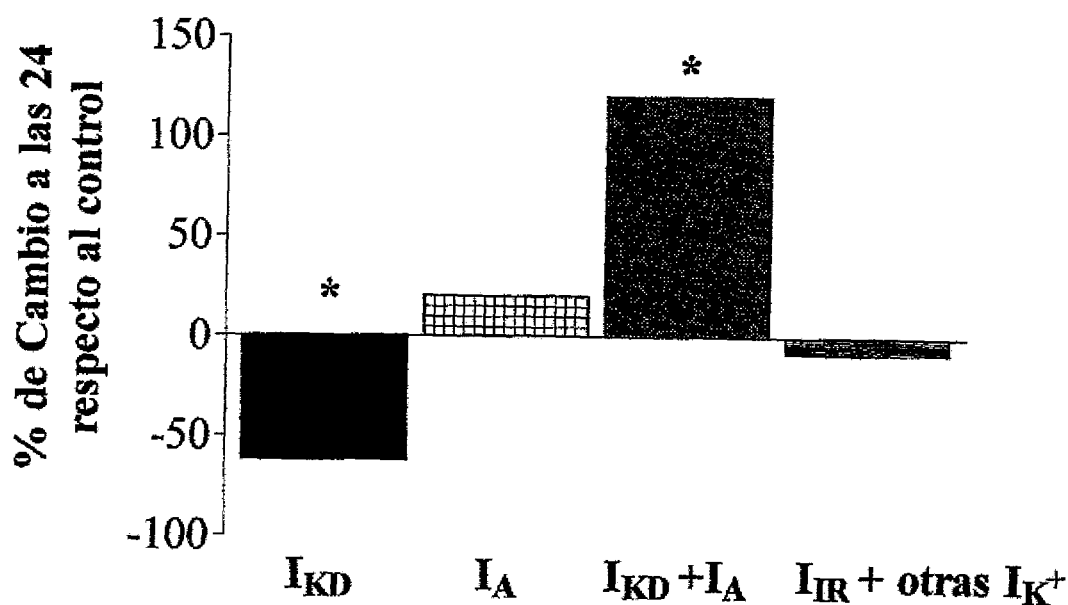


Figura 27

Cambios en la distribución de los fenotipos electrofisiológicos de la glía envolvente respecto al control, después de 24 horas de tratamiento con fracciones de membrana enriquecidas en axones olfatorios. El significado de las leyendas de las barras es el mismo que en la figura 23. El asterisco indica una $P < 0,05$.

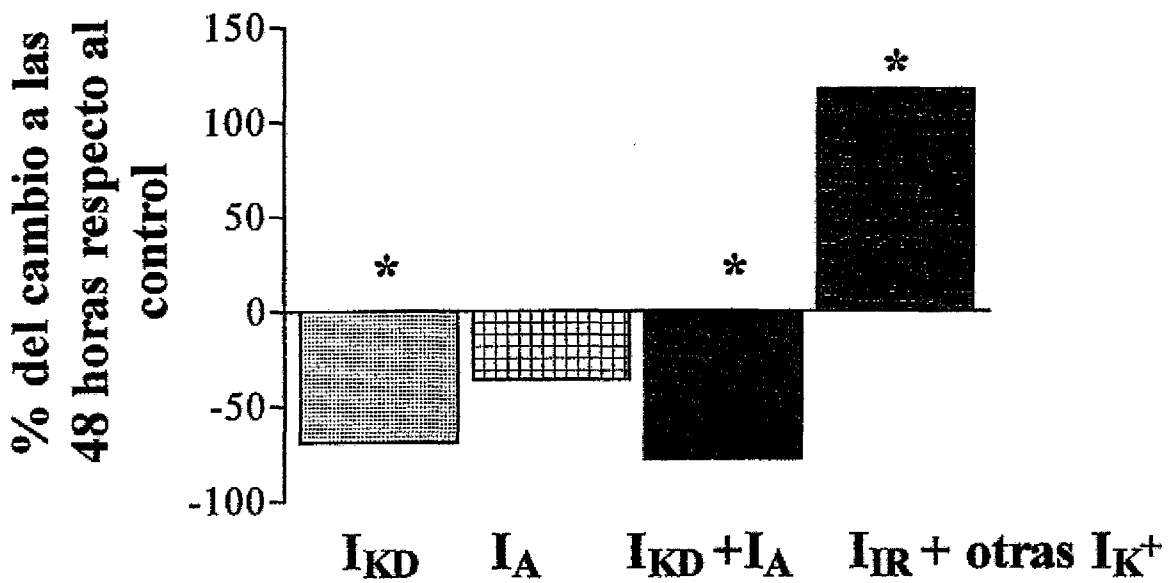


Figura 28

Cambios en la distribución de los fenotipos electrofisiológicos de la glía envolvente, después de 48 horas de tratamiento con fracciones de membrana enriquecidas en axones olfatorios. El significado de las leyendas de las barras es el mismo que en la figura 23. El asterisco indica una $P < 0,05$.

estudiadas (ANOVA de una vía, $P > 0.1$).

La glía envolvente tratada 48 horas, Por el contrario, cambió tanto en la distribución de los fenotipos (Fig. 28) como en el potencial de reposo. La proporción de células que expresan la I_{K_r} junto a otras corrientes de potasio aumentó, y la de glía envolvente que expresan corrientes de tipo rectificador retardado disminuyó apreciablemente ($P = 0.008$, para una χ^2 con 3 grados de libertad, $n = 27$). El potencial de reposo obtenido para la glía envolvente tratada 48 horas fue de -45 ± 2 mV ($n = 12$), significativamente distinto al control (ANOVA de una vía, $P = 0.008$) y con un incremento de 14 ± 4 mV más hiperpolarizado. La densidad de corriente de potasio no cambió respecto al control después de 48 horas de tratamiento con membranas (ANOVA de una vía, $P > 0.1$).

4.8.- Efecto de las fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios sobre las corrientes de calcio y de cloro dependientes de voltaje de la glía envolvente

La glía envolvente se trató durante 24 y 48 horas y se registró con las soluciones apropiadas para el registro de corrientes de calcio y cloro. Los parámetros estudiados fueron los mismos que para las corrientes macroscópicas de potasio. Las células con 24 horas de tratamiento no cambiaron ni sus densidades de corriente (ANOVA de una vía, $P > 0.1$) ni la distribución de los fenotipos ($P = 0.057$, para una χ^2 con 3 grados de libertad, $n = 28$; Fig. 29).

La distribución de los fenotipos a las 48 horas de tratamiento (Fig. 30) varió fuertemente, observándose un fuerte incremento en la proporción de células que expresan corriente de cloro, y una pequeña disminución en las que expresan calcio ($P < 0.0001$, para una χ^2 con 3 grados de libertad $n = 29$).

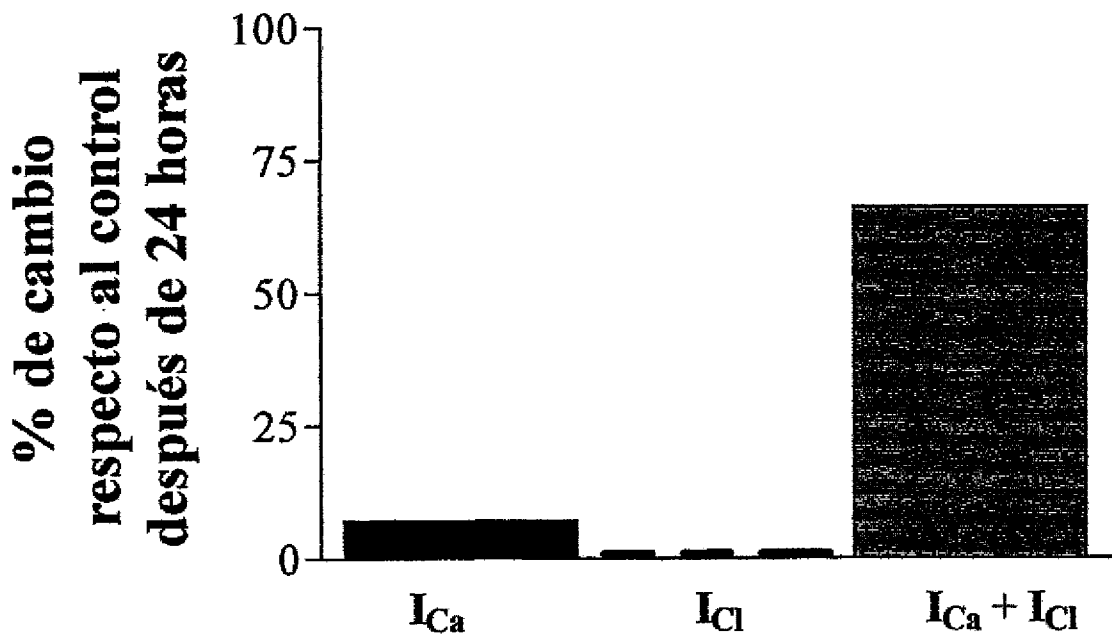


Figura 29

Los efectos en los fenotipos de glía envolvente, desde el punto de vista electrofisiológico, a las 24 horas de tratar los cultivos con fracciones enriquecidas en membrana de axones olfatorios extraídos de las dos primeras capas del bulbo olfatorio. El significado de las leyendas de las barras es el mismo que en la figura 25. Los asteriscos indican $P < 0,05$.

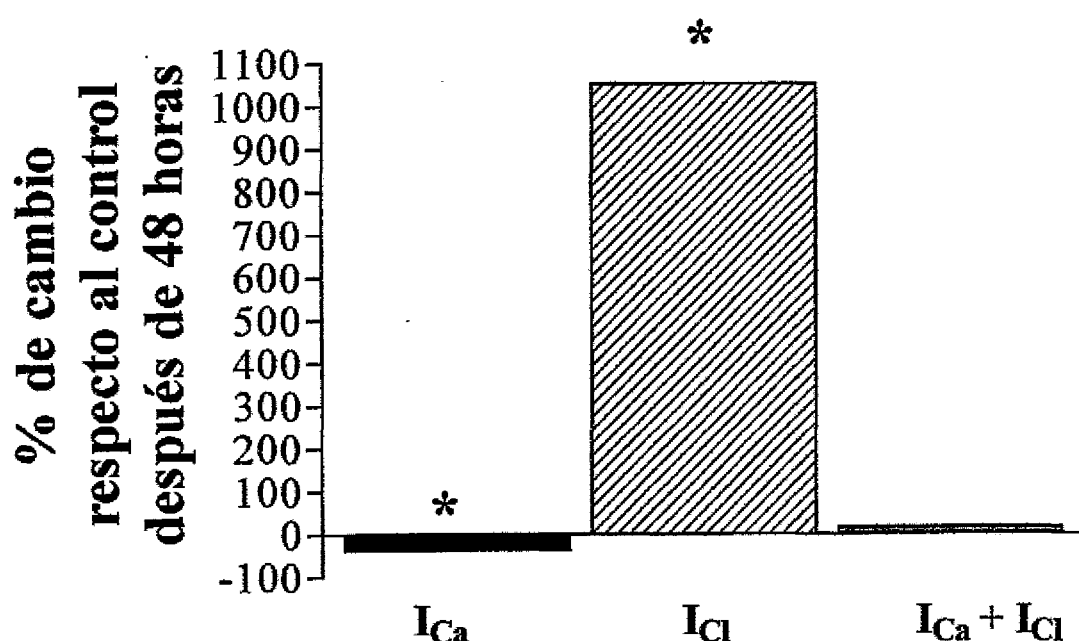


Figura 30

Los efectos en los fenotipos de glía envolvente, desde el punto de vista electrofisiológico, a las 48 horas de tratar los cultivos con fracciones enriquecidas en membrana de axones olfatorios extraídos de las dos primeras capas del bulbo olfatorio. El significado de las leyendas de las barras es el mismo que en la figura 25. Los asteriscos indican $P < 0,05$.

4.9.- Cocultivos de glía envolvente purificada con los neuroblastomas Neuro-2A: **cambios observados en las células de Neuro-2A**

Las células de neuroblastoma se cocultivaron con glía envolvente purificada en una relación 1 célula de Neuro-2A : 8 células de glía envolvente. Después de cuatro días *in vitro*, algunas células desarrollaron neuritas de una longitud superior a dos diámetros del soma celular, observables al inyectar Amarillo Lucifer en el interior de la célula (Fig. 31). Posiblemente algunas de estas neuritas estaban envueltas por prolongaciones (Fig. 32).

La electrofisiología de estas células no cambió en cocultivo con glía envolvente. Al inyectar corriente positiva a estas células se despolarizaron y produjeron espigas lentas. Las células de neuroblastoma cuando se fijaron a un voltaje de membrana de -60 mV y se les aplicó un protocolo de pulsos de voltaje depolarizantes, expresaron corrientes de sodio rápidas que se inactivaron rápidamente, seguidas de corrientes de salida de potasio (Fig. 33).

4.10.- Cocultivos de glía envolvente purificada con el neuroblastoma Neuro-2A: **cambios observados en las células de la glía envolvente**

Desde el punto de vista morfológico, la glía envolvente no cambió, excepto en los lugares donde parecía envolver con una o dos prolongaciones a una neurita procedente del soma de una célula de N2A (Fig. 32).

Las propiedades electrofisiológicas cambiaron en la glía envolvente purificada cocultivada con las células de Neuro-2A. Todas las células de glía envolvente registradas, que estaban en las proximidades de células de neuro-2A, expresaron una corriente transitoria (Fig. 34) con un incremento altamente significativo (ANOVA de una vía, $P=0.0086$; Fig. 35) en la densidad de corriente en el pico a 0 mV (59 ± 27 pA/pF, $n=5$) respecto a la glía envolvente

purificada sin cocultivar (6 ± 1 pA/pF, $n=11$).

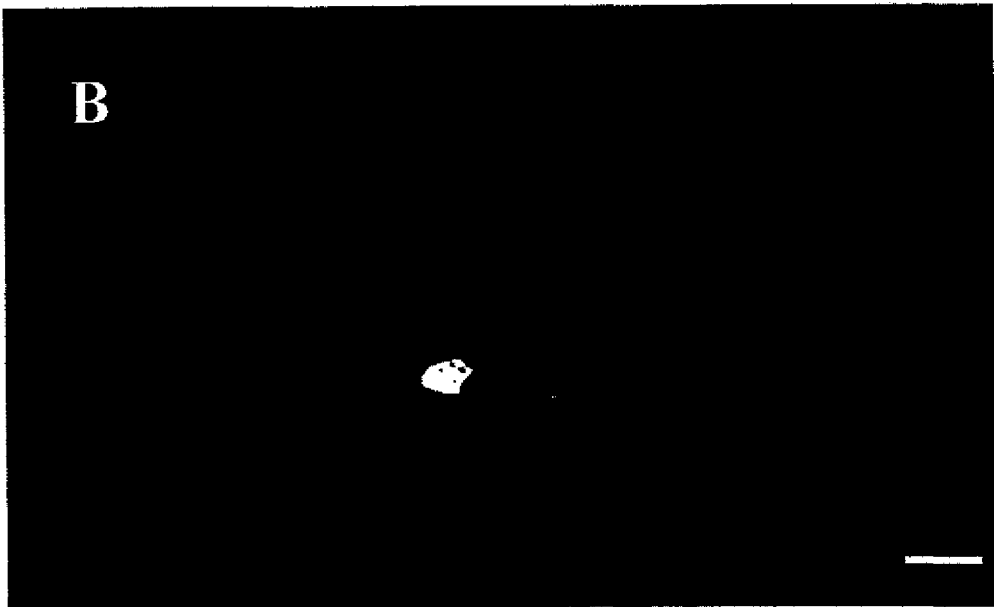
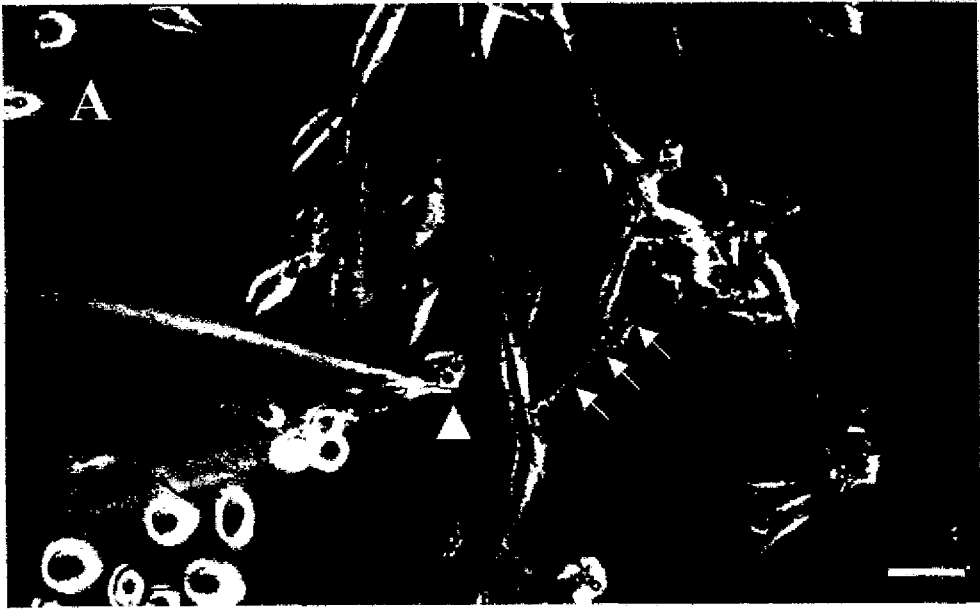


Figura 31
célula de glía envolvente enviando procesos hacia una neurita de Neuro-2A.
A: contraste de fase de una célula de la glía envolvente purificada (cabeza de flecha). **B:** la misma célula de A se rellenó con Amarillo Lucifer durante los registros, así se observa que dos de sus procesos envuelven una prolongación neurítica (flechas). Barra de calibración: 30 μ m.

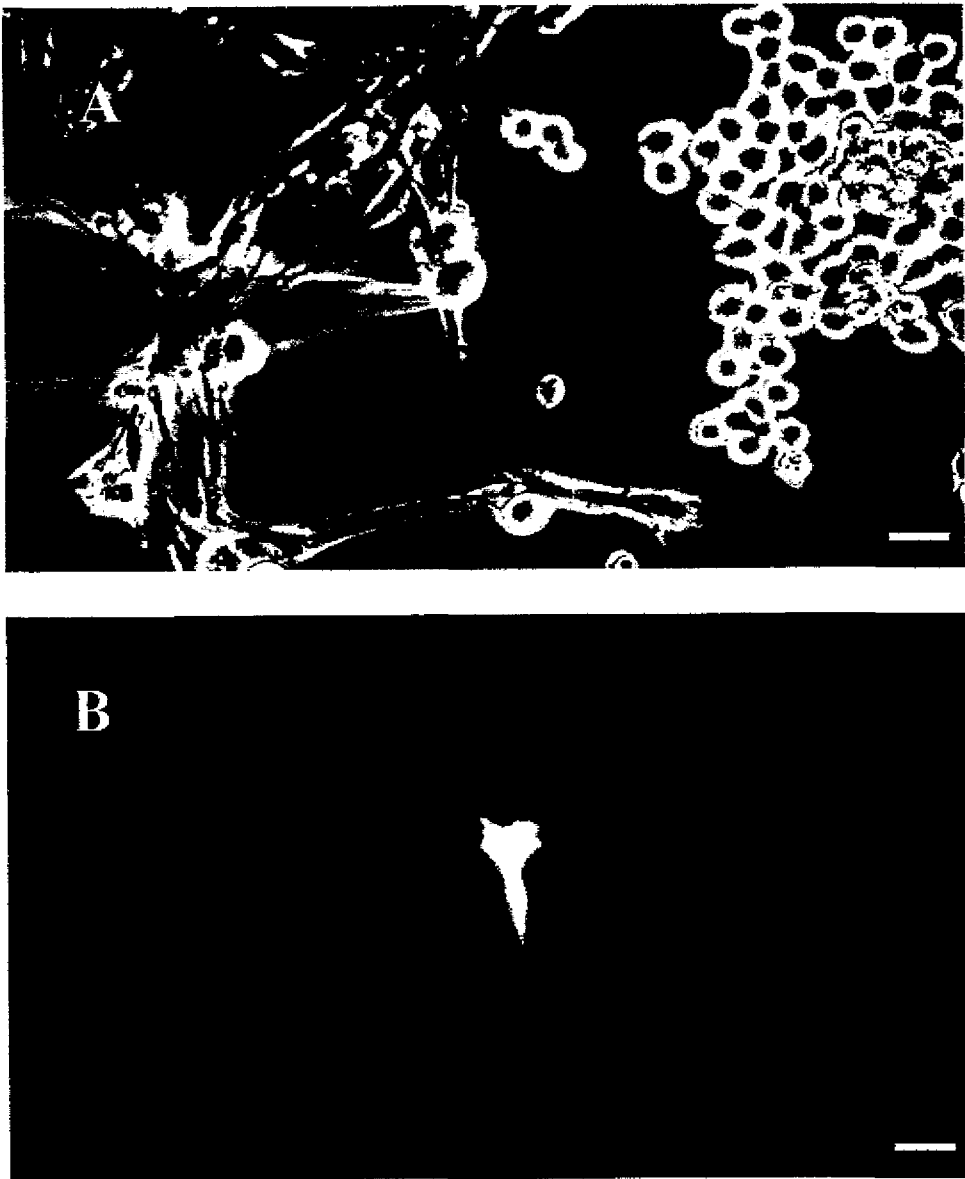
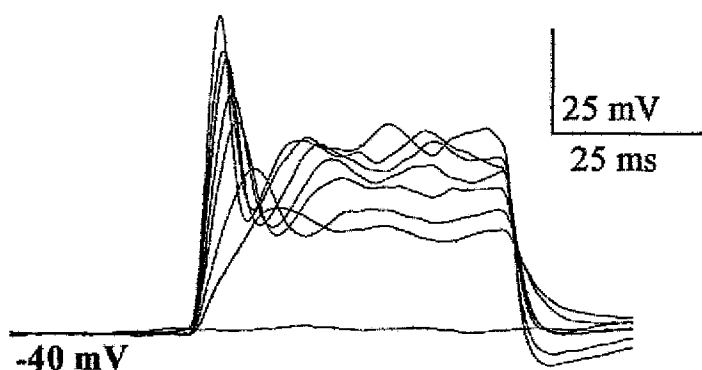
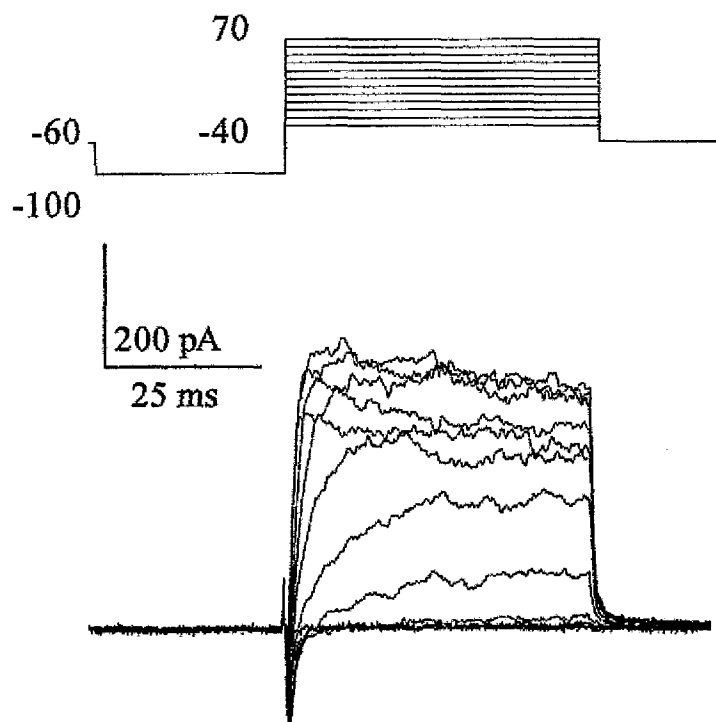


Figura 32

Las células de neuroblastoma Neuro-2A cocultivadas con la glía envolvente se registraron e inyectaron con Amarillo Lucifer disuelto en la solución intracelular. A: célula de neuroblastoma observada bajo contraste de fase. B: imagen de fluorescencia de la misma célula que en A. las barras de calibración tienen un valor de 30 μm .

A**B****Figura 33**

A: trazos obtenidos en el modo de fijación de corriente y aplicando pulsos de corriente positiva a una célula de neuro-2A en cocultivo con glía envolvente, desde su potencial de membrana en reposo (-40 mV). **B:** La misma célula se registró por la técnica de fijación de voltaje obteniendo las corrientes macroscópicas de la figura al aplicar el protocolo situado en la parte superior de la misma.

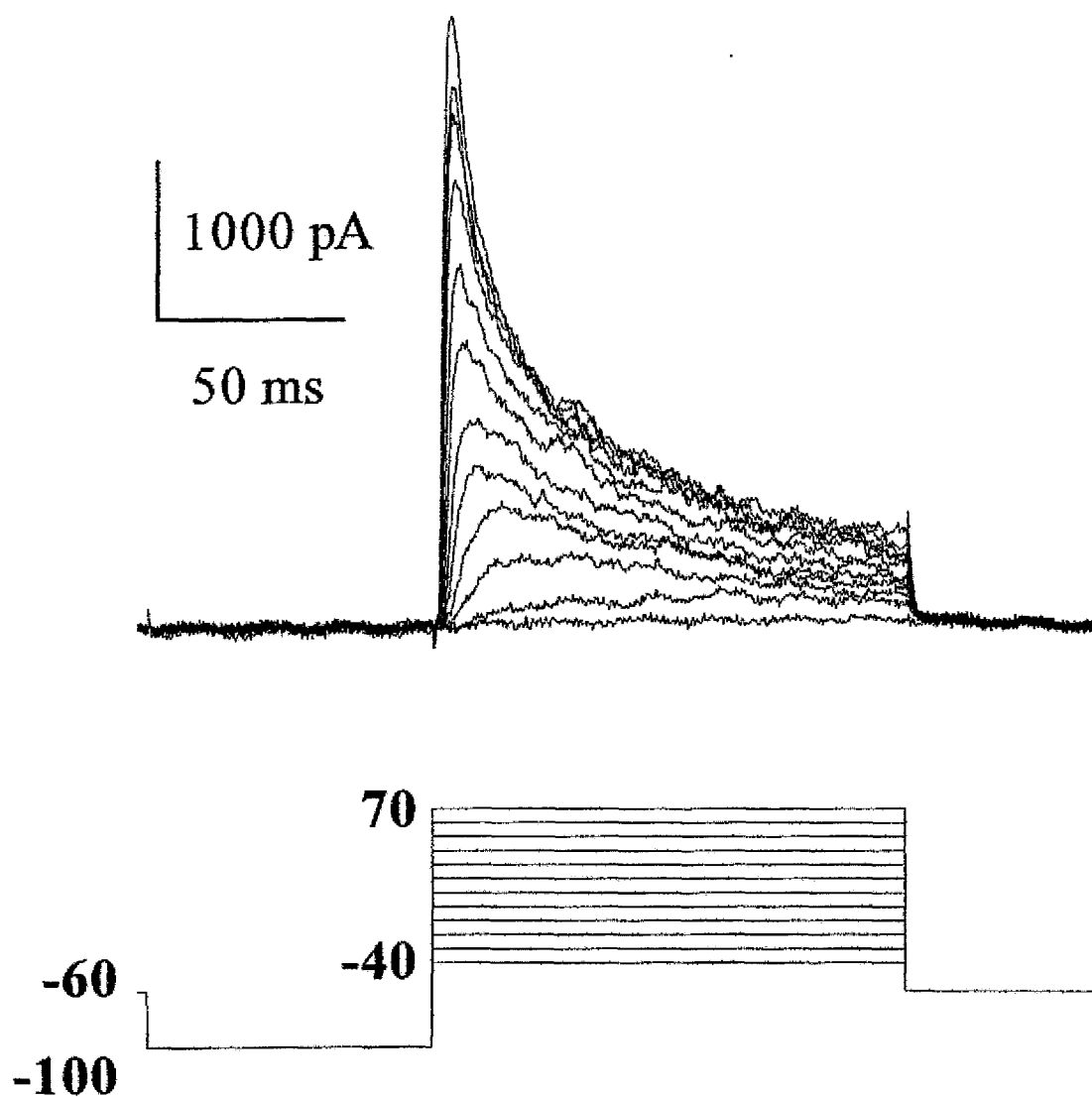


Figura 34

Familia de trazos de corriente obtenida estimulando una célula de glía envolvente cocultivada con Neuro-2A con el protocolo de voltaje que se incluye en la figura.

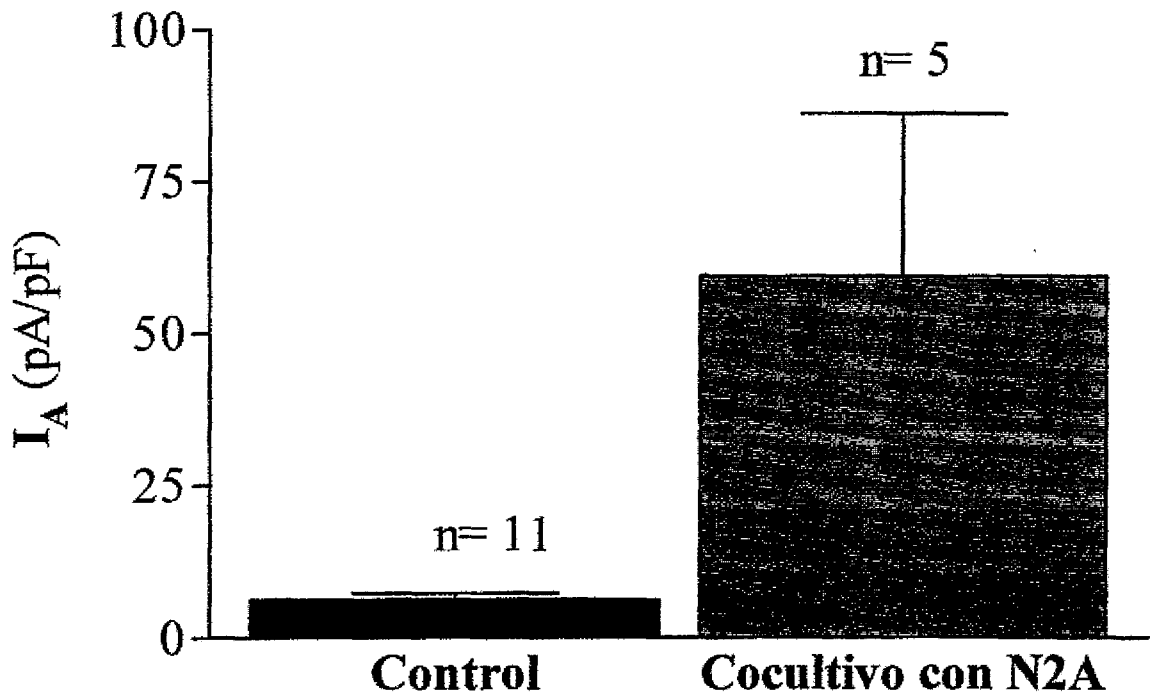


Figura 35

La densidad de la corriente transitoria de potasio, en el pico de la glía envolvente en cocultivo con N2A aumento unas 10 veces con respecto a controles cultivados en ausencia de N2A (one way ANOVA, $P=0.0086$, $n=5$).

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Características electrofisiológicas de la glía envolvente

La glía envolvente, como hemos visto en el capítulo de resultados, expresa corrientes iónicas de potasio, de cloro y calcio dependientes de voltaje que se han observado en otros tipos macrogliales, tanto en los astrocitos como en las células de Schwann (Kolb, 1990; Ritchie, 1992; Sontheimer, 1994, 1995; Duffy y col., 1995; Sontheimer y Ritchie, 1995). Su potencial de membrana en reposo es de -31 mV, en torno a los valores encontrados en células de Schwann. En los cultivos de glía envolvente tratadas con fracciones de membranas enriquecidas en axones olfatorios se registró una hiperpolarización hasta -45 mV, como le ocurre a las células de Schwann tratadas con mitógenos (Barres y col., 1990).

La glía envolvente expresa dos variantes de corriente de potasio de tipo rectificador retardado. Estas corrientes de potasio se caracterizan, en general, por ser corrientes de salida de potasio, que se activan al despolarizar la membrana por encima de -40 mV y como consecuencia su conductancia se incrementa, con el tiempo, de forma sigmoidal. Su inactivación es mínima frente a las despolarizaciones mantenidas en el tiempo. Se bloquea con cesio intracelular, y con tetraetilamonio y 4-aminopiridina extracelulares.

$V_{1/2}$ es un parámetro cinético específico para cada tipo de corriente, que se define como el potencial de membrana en el que la conductancia de la corriente es igual a la mitad de la conductancia máxima de ésta. La $V_{1/2}$ predice que la mitad de los canales subyacentes a la corriente observada estarán activados en el estado estacionario. El valor de este parámetro permite diferenciar entre sí a las corrientes de potasio encontradas. Las células de Schwann

de conejo expresan dos tipos de rectificadores retardados (tipo I y tipo II) similares a los encontrados en la glía envolvente (Baker y col., 1993; Baker y Ritchie, 1996). Por el contrario los $V_{1/2}$ de activación (el valor de $V_{1/2}$ es igual a -25.8 mV para I_{KD1} de -9.2 mV para I_{KD2}) están ligeramente desplazados hacia valores más hiperpolarizados, posiblemente estén activas en potenciales de membrana cercanos al de reposo y contribuyan al mantenimiento de éste.

Los valores de las constantes de tiempo de activación de I_{KD1} e I_{KD2} , tomados en un valor de potencial de membrana de -10 mV, son similares a los encontrados en los tipos de rectificadores retardados, de los tipos I y II encontrados en las células de Schwann. Pero, la corriente de tipo II presenta inactivación lenta dependiente de voltaje y es capaz de inactivarse totalmente con un prepulso de 0 mV antes de aplicarle los pulsos de estimulación, propiedad que no presenta la I_{KD2} de la glía envolvente. Asimismo, los dos rectificadores retardados que presenta la glía envolvente no presentan inactivación dependiente de voltaje, mientras que la corriente de tipo I de las células de Schwann presenta inactivación parcial (Baker y Ritchie, 1996). Estos datos muestran que los rectificadores retardados de la glía envolvente no son los mismos que los que presentan las células de Schwann y que los desplazamientos de las curvas conductancia respecto al voltaje y de las curvas de inactivación no se deben a una fijación defectuosa del voltaje de la célula causado por la resistencia en serie, ya que los errores de voltaje, dados por el producto $R_s I_{max}$, nunca fueron superiores a 5 mV.

Los astrocitos también expresan corrientes de tipo rectificador retardado, cuya expresión ha sido estudiada recientemente mediante el análisis de los productos obtenidos de la retrotranscripción del contenido de ARN en el citoplasma de astrocitos de corteza de ratón absorbido con las micropipetas de *patch-clamp* con las que se registraron. Con este método obtienen copias de ADN que se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) y después los productos son analizados por técnicas convencionales de biología molecular. Los astrocitos de ratón muestran altos niveles de expresión de transcritos de Kv1.6 (Smart y col., 1997). Los registros de esas mismas células revelan la existencia de una corriente de tipo rectificador retardado de activación lenta, que se activa por encima de -40 mV y de poca inactivación con despolarizaciones sostenidas; y que se bloquea por dendrotoxina 100 nM; de forma similar a lo que ocurre con la corriente de tipo I de las células de Schwann (Baker y col., 1993; Baker y Ritchie, 1996).

La corriente de tipo transitoria observada en la glía envolvente es muy parecida a la corriente de tipo A observada en otros tipos gliales, el umbral de activación está cerca de -50 mV y el $V_{1/2}$ es igual a -16 mV para la activación y el $V_{1/2}$ para la inactivación es de -97 mV y su tiempo al pico en +60 mV es de 15 ms. Los valores de los parámetros de activación e inactivación son similares a los encontrados en los astrocitos, en particular el $V_{1/2}$ de inactivación (definido como el potencial de membrana, en el cual la mitad de los canales iónicos están inactivados en el estado estacionario) es muy similar al encontrado en las células precursoras de los astrocitos (Duffy y col., 1995). Las células de Schwann de rata y de humano poseen una corriente de salida de potasio con un componente transitorio dominante cuando se le aplican pulsos despolarizantes (Konishi, 1989). Esta corriente es similar a la encontrada en la glía envolvente. A pesar de esto, en otras células de glía envolvente la corriente transitoria está coexpresada junto a una corriente de tipo rectificador retardado. Estos datos sugieren que la corriente transitoria de la glía envolvente puede ser la misma que la encontrada en los otros tipos macrogliales. Esta corriente está regulada, tal y como se ha observado registrando la corriente transitoria en células de Schwann de ratón. En estas células, se ha observado que la expresión de la corriente transitoria descende al cultivarlas en

presencia de explantes de nervio periférico, de neuronas de los ganglios de las raíces dorsales o tratándolas con análogos del AMP_a (Despeyroux, 1994). La corriente transitoria en el núcleo estriado de la rata, sin embargo, contribuye a la diferenciación de los astrocitos tipo 1 y tipo 2, donde aumenta la expresión de este tipo de corriente (Shimano y col., 1996).

Las corrientes de calcio dependientes de voltaje están ampliamente distribuidas y prácticamente todos los tipos celulares de mamífero las poseen: células gliales, neuronas, miocitos, células epiteliales, etc. (Sontheimer, 1995). La glía envolvente posee una corriente de calcio de alto umbral de activación, que es bloqueada por cadmio aplicado extracelularmente. Los canales que probablemente contribuyen a esta corriente sean los canales de tipo L y los de tipo N, como los encontrados en astrocitos (Sontheimer y Ritchie, 1995) y células de Schwann (Amédée y col., 1991). La glía envolvente se diferencia de estos tipos macrogliales por la ausencia de corrientes de calcio de tipo T o bajo umbral de activación y de sodio dependientes de voltaje. La expresión de corrientes de calcio en astrocitos y células de Schwann, en cultivo en medio con suero, depende de la presencia de neuronas o factores liberados por ellas; sin ellas no se expresan estas corrientes (Corvalan y col., 1990; Amédée y col., 1991). Pero un 60% de las células de la glía envolvente en cultivo primario expresan corrientes de calcio, las cuales podrían estar activas durante el potencial de reposo, dando lugar a una pequeña entrada de calcio al interior celular, que podría estar modulando el estado proliferativo y funcional de la célula. También, se ha observado recientemente que el bloqueo de canales de calcio de tipo L y N en cultivos de neuronas ganglionares de la retina cultivadas sobre una monocapa de glía envolvente se reduce en un 20% el número de neuritas de una longitud mayor a cuatro diámetros somáticos (comunicación personal de la Dra. C. Wigley). Los canales de calcio de alto umbral pueden

estar modulando la expresión de moléculas de adhesión y, por tanto, la capacidad de permitir el crecimiento de los axones olfatorios. También podrían contribuir a la homeostasis iónica en regiones lesionadas del sistema nervioso, al aumento de la descarga de neurotrofinas que promuevan la supervivencia y la diferenciación neuronal, como en los astrocitos reactivos donde aumenta la expresión de canales de calcio de tipo L en respuesta a distintos tipos de lesiones cerebrales (Westenbroek y col., 1998).

Los astrocitos y las células de Schwann expresan corrientes de cloruro operadas por voltaje que se activan con potenciales de membrana cercanos a los de reposo y que producen una entrada de aniones cloruro al interior celular (Bevan y col., 1985; Sontheimer, 1994). La glía envolvente posee una corriente de cloro de tipo rectificador saliente que presenta estas características y una corriente de tipo rectificador de entrada que se activa en potenciales más negativos que -70 mV. La naturaleza iónica de esta corriente de entrada no está clara y se caracteriza por no presentar inactivación cuando se aplican grandes pulsos hiperpolarizantes, lo que las diferencia de algunos subtipos de canales de potasio de tipo rectificador anómalo. El potencial de reversión de esta corriente de entrada está más cercano al potencial de membrana en reposo que del potencial de equilibrio para el potasio en las soluciones salinas utilizadas (bajo potasio extracelular/alto potasio intracelular). Estas características son similares a la corriente de cloro rectificadora de entrada presente en astrocitos corticales de rata (Ferroni y col., 1997).

Una gran permeabilidad pasiva a cloruro y potasio, junto a mecanismos activos (bombas de cloruro) que mantienen unas concentraciones bajas de cloruro en el medio intracelular de la glía envolvente, así como canales dependientes de voltaje (cloro y potasio), contribuye posiblemente a mantener el valor del potencial de membrana en reposo en un valor

tan despolarizado como -31 mV. Así mismo, los excesos de potasio en el medio extracelular, debidos a la actividad de los axones olfatorios, pueden mantenerse en niveles que no afecten la excitabilidad de éstos ya que la activación conjunta de canales de cloruro y potasio daría como resultado una incorporación neta de ClK al medio intracelular. La función de los canales de salida de potasio en glía, como los rectificadores retardados o la corriente transitoria, no está clara, pero parecen tener un papel clave en la homeostasis de la concentración de potasio extracelular, permitiendo su salida de la célula glial en lugares alejados de intensa actividad de disparo neuronal. En la glía envolvente este lugar podría ser en el medio externo al espacio donde está el paquete de axones olfatorios, que están envueltos por una lamela de membrana de glía envolvente. La difusión libre y la acción conjunta de los canales iónicos operados por voltaje de cloro y potasio, activados por la despolarización (debido a un aumento de la concentración de potasio extracelular) causada por la actividad neuronal, pueden introducir potasio al interior celular. La actividad de la Na/K-ATPasa y el cotransportador Na/K/2Cl pueden contribuir también a retirar el potasio extracelular, el cual podría salir por otras áreas de membrana alejadas de la actividad de los axones olfatorios, como se ha sugerido para otros tipos gliales (Barres y col., 1990; Sontheimer, 1994; Amédée y col., 1997).

Los canales de potasio rectificadores retardados y los de cloro parecen jugar un papel relevante en la proliferación de las células gliales y de otros tipos celulares no neuronales como los linfocitos (Chiu y Wilson, 1989; Pappas y col., 1994; Sontheimer, 1994; Sontheimer y col., 1995).

5.2.- Características fenotípicas de la glía envolvente

Los resultados muestran que la glía envolvente, desde el punto de vista de la electrofisiología, se comporta como una población homogénea con independencia de la morfología. Pero, se observa que el fenotipo de la población no es único, existen conjuntos de células de la glía envolvente en cultivo primario que expresan una serie de corrientes que no expresan otras. Además, la distribución de estos fenotipos cambia con la edad del cultivo y cuando las células se tratan con fracciones enriquecidas en membranas de axones olfatorios.

La evolución va desde unas poblaciones (6-15 días *in vitro*) que al principio poseen células que sólo expresan el rectificador retardado o la corriente A, las que coexpresan las dos anteriores y las que coexpresan el rectificador de entrada y cualquiera de las anteriores corrientes de salida, hasta unas poblaciones donde predominan las células que coexpresan el rectificador retardado y la corriente transitoria.

Los fenotipos para las corrientes de calcio y cloro muestran que la población inicial (6-15 días en cultivo) está formada predominantemente por células que expresan la corriente de calcio (>50%, con <10% que coexpresan la corriente de calcio y cloro). Las proporciones de cada subtipo se hacen similares con el tiempo en cultivo, es decir, las proporciones se homogeneizan.

Desde el punto de vista electrofisiológico, los cuatro fenotipos encontrados en cultivo primario en el periodo que va desde los 6 a los 15 días *in vitro* se mantienen cuando la glía envolvente se purifica mediante bolas magnéticas recubiertas con anticuerpos que reaccionan contra la p75.

La glía envolvente se trató con fragmentos de membrana enriquecidos en axones, que

es conocido como mitogénico y modulador de la expresión de canales dependientes de voltaje en células de Schwann de ratón, en las que induce un aumento de las corrientes de sodio y del rectificador retardado. A pesar de ello, en la glía envolvente no se inducen tales cambios en la expresión de las corrientes, excepto el cambio en el potencial de membrana hacia valores más hiperpolarizados (alcanzando un valor de -45 mV) dentro de la ventana de potencial óptima para la proliferación de las células de Schwann. Los cultivos primarios de glía envolvente, como consecuencia del tratamiento con fragmentos de membrana, sufren cambios en las proporciones fenotípicas de la glía envolvente purificada. Esto sugiere que las células que expresan el rectificador de entrada y la corriente de cloro, que son predominantes en el cultivo tratado, puede que sobrevivan mejor o que se dividan más, dando lugar a un aumento en la cantidad relativa de células en el cultivo que posee estos fenotipos. Además el potencial de membrana en reposo de las células tratadas se hiperpolariza a -45 mV, dentro de la ventana de potencial de membrana en reposo permisivo para la proliferación sugerida para las células de Schwann (Wilson y Chiu, 1993).

5.3.- Cocultivos de glía envolvente con la línea de neuroblastoma Neuro-2A

La expresión de los canales iónicos en la macroglía está fuertemente modulada por factores solubles de origen neuronal o por contacto de la membrana de las células gliales con la de las neuronas adyacentes y viceversa. Asimismo, los factores liberados por las células gliales modula la expresión de canales iónicos de las neuronas. Las células de Schwann de rata cocultivadas con neuronas sensoriales de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal incrementan la expresión de las subunidades que forman el poro del canal de sodio

en las neuronas acompañado por un aumento paralelo de la densidad de la corriente de sodio respecto a los controles, siendo el incremento mayor que si éstas se tratan con el medio condicionado por la célula glial (Hinson y col., 1997). Los astrocitos también son capaces de regular la expresión de canales de líneas celulares de origen neuronal; el medio condicionado de cultivos de astrocitos corticales induce un aumento en la expresión de las corrientes iónicas de sodio y de calcio dependientes de voltaje en el neuroblastoma humano NB69 y posiblemente en neuronas *in situ* (Urbano y col., 1997a y 1997b).

Las células de los cultivos purificados de astrocitos de ratas recién nacidas sólo expresan corrientes de salida de potasio, cuando se cocultivan con neuronas embrionarias de corteza. Después de 7 a 10 días *in vitro*, un 53% de los astrocitos expresan corrientes de calcio de los tipos L y T (Corvalan y col., 1990), al igual que cuando se tratan con AMP₀ (Sontheimer, 1994).

Las células de Schwann de ratón cuando están en cultivo organotípico sufren un descenso en la expresión de la corriente de potasio transitoria (Despeyroux y col., 1994). La expresión de los canales de sodio y de calcio requieren la presencia de neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal y, cuando explantes que contienen estos ganglios se retiran de cultivos de células de Schwann, estas corrientes desaparecen (Amédée y col., 1991).

La glía envolvente purificada se cocultivó con células de neuroblastoma de ratón Neuro-2A durante cuatro días y se observó que la densidad de la corriente transitoria aumenta 10 veces respecto a los controles, indicando un aumento en la incorporación canales en la membrana que contribuyen a este tipo de corriente y, también, todas las células adyacentes

o que estaban en contacto con una neurita de la célula N2A registrada, la expresaban. Aunque no podemos excluir la existencia de otras combinaciones fenotípicas en las placas que contenían el cocultivo, por el reducido número de datos recogidos ($n=5$). Este resultado es similar al encontrado en astrocitos de tipo 1 y de tipo 2 del núcleo estriado cuando se tratan con los extractos procedentes de núcleos estriados que no poseen dopamina, en los cuales la densidad de la corriente transitoria aumenta tres veces respecto a los controles después de tres días de tratamiento con el extracto en los de tipo 1 y dos veces en los de tipo 2 (Shimano y col., 1996). La conductancia específica (conductancia/capacitancia) de los astrocitos en un modelo *in vitro* de cicatriz glial se incrementa hasta alcanzar un máximo a las seis horas después de la lesión, aproximadamente dos veces más que los astrocitos que están fuera de la cicatriz glial (MacFarlane y Sontheimer 1997).

La glía envolvente en cultivo posee canales iónicos operados por voltaje y es capaz de responder a una diversidad de cambios en su medio ambiente: membranas axonales, que producen una selección en los fenotipos de la población desde el punto de vista de la electrofisiología y un desplazamiento en el valor de su potencial de membrana hacia valores más hiperpolarizados, del mismo modo responden a la presencia de células de origen neuronal y a factores liberados por ellas aumentando la expresión de la corriente de potasio transitoria de la glía envolvente.

La función de los canales iónicos dependientes de voltaje en las células de la glía no está claro y es difícil asignarles un papel que explique algunas de las propiedades especiales de este tipo macroglial, como el promover la migración de los axones olfatorios hacia sus dianas en el bulbo y de la regeneración de determinadas áreas lesionadas del SNC (Ramón

Cueto y Nieto Sampedro, 1994; Gudiño Cabrera y Nieto Sampedro, 1996).

La principal función sugerida para los canales iónicos de cloro y potasio en la glía se refieren a la homeostasis de las concentración de potasio extracelular durante periodos de actividad neuronal (Barres y col., 1990; Sontheimer, 1994). Amédée y col. (1997) ofrecen un modelo de redistribución de potasio con un mínimo gasto energético que puede adaptarse a las características de la glía envolvente. La glía envolvente recubre, mediante lamelas de membrana, haces de axones olfatorios densamente empaquetados (Doucette, J. R., 1984; Ramón Cueto y Nieto Sampedro, 1992; Ramón Cueto y col., 1993), los cuales liberan potasio durante su actividad (Fig. 22). El control de la proliferación celular de la glía envolvente, como en las células de Schwann y los astrocitos, puede estar influida por la expresión y activación de canales de potasio operados por voltaje. El bloqueo de los canales de potasio mediante TEA y 4-AP detiene e inhibe la proliferación de ambos tipos celulares (Wilson y Chiu, 1993; Pappas y col., 1994). La expresión de canales de potasio operados por voltaje disminuye la actividad de la proteína tirosina-quinasa y, asimismo, estas quinasas son capaces de asociarse a través de dominios SH3 (como el oncogén Src que codifica la Src-tirosina-quinasa) a motivos en la secuencia de los canales de potasio dependientes de voltaje ricos en prolinas (Holmes y col., 1996; 1997). La glía envolvente puede responder con una entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje a la despolarización producida por la elevación de la concentración de potasio, causada por la actividad de los axones olfatorios.

Los canales de calcio en la glía, teniendo en cuenta que producen un aumento de la concentración de calcio citosólico, potencialmente podrían iniciar eventos intracelulares tales como la fosforilación de proteínas mediante quinasas dependientes de calcio y la proliferación o la muerte celular según el estado funcional de la célula. La entrada de calcio en la glía

envolvente al activarse los canales debido a la despolarización de la membrana durante la actividad neuronal por aumento de la concentración de potasio extracelular, podría contribuir a mantener la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de factores tróficos necesarios para el crecimiento y mantenimiento de los axones olfatorios, como ocurre en otros tipos gliales cuando contactan con neuronas (Ritchie, 1992; Sontheimer y Ritchie, 1995).

Las propiedades electrofisiológicas de la glía envolvente y su modulación por el contacto con neuronas requiere un estudio más extenso en modelos *in vitro*, en los que estas células envuelvan las prolongaciones axonales de neuronas y no de líneas neuronales. En el caso de la línea Neuro-2A, estas prolongaciones no son envueltas, aunque se produce una modulación muy marcada de la corriente transitoria de la glía envolvente. También será necesaria una caracterización de las poblaciones de glía envolvente del bulbo olfatorio y un análisis correlacional con los fenotipos electrofisiológicos encontrados en cultivo primario, lo cual requerirá estudios en rodajas de bulbo olfatorio y estudios morfológicos más detallados.

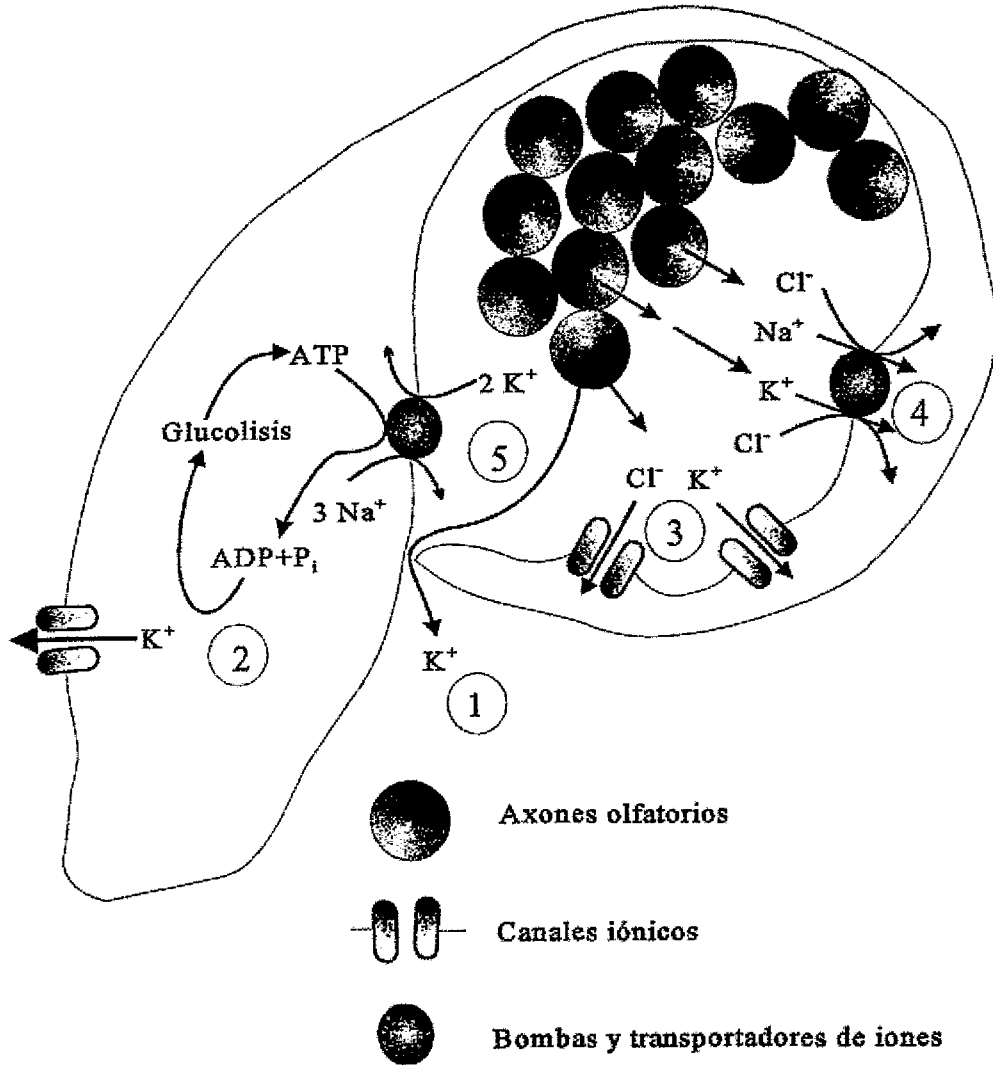


Figura 36

El potasio liberado por los axones olfatorios puede salir del espacio intralamelar por difusión (1). El K^+ captado por la célula glial puede ser redistribuido hacia áreas alejadas de la actividad neuronal (2). El potasio puede entrar en la célula a través de canales de potasio (3), mediante el cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (4) y por la acción de la bomba Na^+/K^+ (5), cuando estos sistemas están situados en áreas de membrana próximas o en contacto con los axones olfatorios. Estos sistemas de control de la concentración de potasio intralamelar en la glía envolvente pueden estar controlando la excitabilidad de los axones olfatorios, tanto de los axones que migran hacia el bulbo olfatorio como de los que han llegado y han echo sinapsis en los glomerulos.

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

De este trabajo, se deducen las siguientes conclusiones:

1.- La glía envolvente en cultivo primario y purificada expresa los diversos tipos de canales iónicos operados por voltaje. Estos incluyen:

- Dos corrientes de potasio de tipo rectificadores retardados con propiedades cinéticas diferenciadas.
- Una corriente de potasio transitoria o tipo A.
- Una corriente de entrada activada por hiperpolarización de naturaleza iónica desconocida.
- Una corriente de calcio de alto umbral de activación.
- Una corriente de cloro con rectificación de salida.

2.- Los cultivos de glía envolvente no forman una población homogénea desde un punto de vista electrofisiológico, existiendo variabilidad en los tipos de corrientes expresadas.

3.- El fenotipo electrofisiológico de la glía envolvente en cultivo cambia con la edad del cultivo, así como en respuesta al tratamiento con fragmentos de axones olfatorios.

5.- Las células de la glía envolvente no desarrollan acoplamiento electrotónico (medido con colorante).

6.- La glía envolvente y la línea celular neuro-2A en cocultivo se influncian mutuamente produciendose un cambio fenotípico en ambos tipos celulares.

BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Amédée, T.; Ellie, E.; Dupoy, B. y Vincent, J. D. (1991). "Voltage-dependent calcium and potassium channels in Schwann cells cultured from dorsal root ganglia of the mouse". *Journal of Physiology*, **441**: 35-56.
- Amédée, T.; Robert, A. y Coles, J. (1997). "Potassium homeostasis and glial energy metabolism". *Glia*, **21**: 46-55.
- Assouline, J. G. y Pantazis, N. J. (1989). "Detection of a nerve growth factor receptor on fetal human Schwann cells in culture: absence of the receptor on fetal human astrocytes". *Developmental Brain Research*, **45**: 1-14.
- Bakardjiev, A. (1997). "Biosynthesis of carnosine in primary culture of rat olfactory bulb". *Neuroscience Letters*, **227**: 115-118.
- Barber, P. C. y Lindsay, R. M. (1982). "Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes". *Neuroscience*, **7**: 3077-3090.
- Baker, M.; Howe, J. R. y Ritchie, J. M. (1993). "Two types of 4-aminopyridine-sensitive potassium current in rabbit Schwann cells". *Journal of Physiology*, **464**: 321-342.
- Baker, M. D. y Ritchie, J. M. (1996). "Characteristics of type I and type II K⁺ channels in rabbit cultured Schwann cells". *Journal of Physiology*, **490.1**: 79-95.
- Barnett, S. C.; Hutchins, A.-M. y Noble, M. (1993). "Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb". *Developmental Biology*, **155**: 337-

350.

Barres, B. A.; Chun, L. L. Y.; Corey, D. P. (1990). "Ion channels in vertebrate glia".

Annals Reviews in Neuroscience, **13**: 441-474.

Bevan, S.; Chiu, S. Y.; Gray, P. T. A. y Ritchie, J. M. (1985). "The presence of

voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured

astrocytes". *Proceedings of the Royal Society of London (serie B)*, **225**: 299-

313.

Bevan, S.; Chiu, S. Y.; Gray, P. T. A. y Ritchie, J. M. (1985). "The presence of

voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured

astrocytes". *Proceedings of the Royal Society of London (serie B)*, **225**: 299-

313.

Bevan, S. y Raff, M. (1985). "Voltage-dependent potassium currents in cultured

astrocytes". *Nature*, **315**: 229-232.

Black, J. A.; Waxman, S. G.; Friedman, B.; Elmer, L. W. y Angelides, K. J. (1989).

"Sodium channels in astrocytes of rat optic nerve in situ: immuno-electron

microscopic studies". *Glia*, **2**: 353-369.

Blanes, T. (1898). "Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo

olfatorio". *Revista Trimestral Micrográfica*, **Tomo III**: 99-127.

Bunge, R. P. (1987). "Tissue culture observations relevant to the study of axon-

Schwann cell interactions during peripheral nerve development and repair".

Journal of Experimental Biology, **132**: 21-34.

Cameron, R. S. y Rakic, P. (1991). "Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review

- and Synthesis". *Glia*, 4: 124-137.
- Caterall, W. A. (1995). "Structure and function of voltage-gated ion channels". *Annuals reviews in Biochemistry*, 64: 493-531.
- Chiu, S. Y. (1991). "Funtions and distribution of voltage-gated sodium and potassium channels in mammalian schwann cells". *Glia*, 4: 541-558.
- Chiu, S. Y.; Schrager, P. y Ritchie, J.M (1984). "Neuronal-type Na⁺ and K⁺ in rabbit cultured Schwann cells". *Nature*, 311: 156-157.
- Chiu, S. Y. y Wilson, G. F. (1989). "The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves". *Journal of Physiology*, 408: 199-222.
- Corvalan, V.; Cole, R.; De Vellis, J. y Hagiwara, S. (1990). "Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes". *Proccedings of the National Academy of Science of USA*, 87: 4345-4348.
- Despeyroux, S.; Amédée, T. y Coles, J. A. (1994). "Axon contact is associated with modified expression of functional patassium channels in mouse Schwann cells". *Proccedings of the Royal Academy of London (Serie B)*, 258: 255-260.
- Doucette, J. R. (1984). "The glial cells in the nerve layer of the rat olfactory bulb". *The Anatomical Record*, 210: 385-391.
- Doucette, J. R. (1990). "Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system". *Glia*, 3: 433-449.
- Doucette, J. R. (1991). "SNP-SNC transitional zone of the first cranial nerve". *The Journal of Comparative Neurology*, 312: 451-466.

- Doucette, J. R. (1995). "Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury". *Histology and Histopathology*, **10**: 503-507.
- Duffy, S.; Fraser, D. D. y Macvicar B. A. (1995). "Potassium channels" en *Neuroglia* (Capítulo 11). Editores: Kettenmann, H. y Ransom, B. R. Oxford University Press.
- Ferroni, S.; Marchini, C.; Nobile, M. y Rapisarda, C. (1997). "Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes". *Glia*, **21**: 217-227.
- Francheschini, I. A. y Barnett, S. C. (1996). "Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage". *Developmental Biology*, **173**: 327-343.
- Franklin, R. J. M. y Blakemore, W. F. (1993). "Requirements for Schwann cell migration within CNS environments: a viewpoint". *Int. J. of Devl Neuroscience*, **11**(5): 641-649.
- Gong, Q.; Bailey, M. S.; Pixley, S. K.; Ennis, M.; Liu, W y Shipley, M. T.(1994). "Localization an regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory sistem during development and regeneration". *The Journal of Comparative Neurology*, **344**: 336-348.
- Gudiño Cabrera, G. y Nieto Sampedro, M. (1996). "Ensheathing cells: large scale purification from adult olfactory bulb, freeze-preservation and migration of transplanted cells in adult brain". *Restorative Neurology and Neuroscience*,

10: 25-34.

Hagg, T.; Portera-Cailliau, C.; Jucker, M. y Engrall, E. (1997). "Laminin of adult mammalian CNS; laminin- α 2 (Merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes". *Brain Research*, **764**: 17-27.

Hille, B. (1992). "Ionic channels of excitable membranes". *Capitulos 1 al 5. Sinauer Associates inc.*.

Hinson, A. W.; Gu, X. Q.; Dib-Hajj, S.; Black, J. A. y Waxman, S. G. (1997). "Schwann cells modulate sodium channel expression in spinal sensory neurons *in vitro*". *Glia* **21**: 339-349.

Holmes, T. C.; Fadool, D. A.; Ren, R. y Levitan, I. B. (1996). "Association of Src tyrosine kinase with human potassium channel mediated by SH3 domain". *Science*, **274**: 2089-2091.

Holmes, T. C.; Berman, K.; Swartz, J. E.; Dagan, D y Levitan, I. B. (1997). "Expression of voltage-gated potassium channels decreases cellular protein tyrosine phosphorylation". *The Journal of Neuroscience*, **17(23)**: 8964-8974.

Jessen, K. R. y Mirsky, R. (1991). "Schwann cells precursors and their development". *Glia*, **4**: 185-194.

Kettenmann, H.; Okland, R. K. y Lux, H. D.; Schachner, M. (1982). "Single potassium channel currents in cultured mouse oligodendrocytes". *Neuroscience Letters*, **32**: 41-46.

Kolb, H.-A. (1990). "Potassium channels in excitable an non-excitable cells". *Reviews in physiology, biochemismtry and pharmacology*, **115**: 51-91.

-
- Komiyama, A. y Suzuki, K. (1992). "Age-related differences in proliferative responses of Schwann cells during wallerian degeneration". *Brain Research*, **573**: 267-275.
- Konishi, T. (1989). "Voltage-dependent potassium channels in cultured mammalian Schwann cells". *Brain research*, **499**: 273-280.
- Konishi, T. (1990). "Voltage-dependent potassium currents in myelinating Schwann cells in the mouse". *Journal of Physiology*, **431**: 123-139.
- Li, Y.; Field, P. M. y Raisman, G. (1997). "Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells". *Science*, **277**: 2000-2002.
- Liesi, P. (1985). "Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones". *The EMBO Journal*, **4**: 2505-2511.
- MacFarlane, S. N. y Sontheimer, H. (1997). "Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis *in vitro*". *The Journal of Neuroscience*, **17**(19): 7316-7329.
- Minturn, J. E.; Sontheimer, H.; Black, J. A.; Ransom, B. R. y Waxman, S. G. (1992). "Sodium channel expression in optic nerve astrocytes chronically deprived of axonal contact". *Glia*, **6**: 19-29.
- Norgren, R. B. Jr.; Ratner, N. y Brackenbury, R. (1992). "Development of olfactory nerve glia defined by a monoclonal antibody specific for Schwann cells". *Developmental Dynamics*, **194**: 231-238.
- Ouesmar, B. N.; Vignais, L.; Duhamel-Clérin, E.; Avellana-Adalid, V.; Rougon, G. y Baron-Van Evercooren, A. (1995). "Expression of the highly polysialylated

- neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord". *European Journal of Neuroscience*, 7: 480-491.
- Pappas, C. A.; Ullrich, N. y Sontheimer, H. (1994). "Reduction of glial proliferation by K⁺ channel blockers is mediated by changes in pH_i". *Neuroreport*, 6: 193-196.
- Pixley, S. H. (1992). "The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both *In vivo* and *In vitro*". *Glia*, 5: 269-284.
- Raisman, G. (1985). "Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons". *Neuroscience*, 14(1): 237-254.
- Ramón Cueto, A. y Nieto Sampedro, M. (1992). "Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells". *Neuroscience*, 47: 213-220.
- Ramón Cueto, A.; Pérez, J. y Nieto Sampedro, M. (1993). "In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb". *European Journal of Neuroscience*, 5: 1172-1180.
- Ramón Cueto, A. y Nieto Sampedro, M. (1994). "Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants". *Experimental Neurology*, 127: 232-244.
- Ramón Cueto, A. y Valverde, F. (1995). "Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties". *Glia*, 14: 163-173.

- Ransom, B. R. y Orkand, R. K. (1996). "Glial-neuronal interactions in non-synaptic areas of the brain: studies in the optic nerve". *Trends in Neuroscience*, **19**: 352-358.
- Ritchie, J. M. (1992). "Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia". *Trends in Neuroscience*, **15**(9):345-350.
- Ritchie, J. M.; Black, J. A.; Waxman, S. G. y Angelides, K. J. (1990). "Sodium channels in the cytoplasm of Schwann cells". *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **87**: 9290-9294.
- Salzer, J. L. y Bunge, R. P. (1980). "Studies of Schwann cell proliferation". *Journal of Cell Biology*, **84**: 739-752.
- Sassoè-Pognetto, M.; Cantino, D.; Panzanelli, P.; Verdun di Cantogno, L.; Giustetto, M.; Margolis, F. L.; De Biasi, S. y Fasolo, A. (1993). "Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory reurones". *Neuroreport*, **5**: 7-10.
- Shimano, Y.; Fukuda, A.; Fujimoto, I.; Hida, H.; Nakajima, K.; Okabe, A. y Nishino, H. (1996). "Tissue extract from dopamine-depleted striatum enhances differentiation of cultured striatal type-1 astrocytes". *Neuroscience Letters*, **205**: 193-196.
- Smart, S. L.; Bosma, M. M. y Tempel, B. L. (1997). "Identification of the delayed rectifier potassium channel Kv 1.6, in cultured astrocytes". *Glia*, **20**(2): 127-134.
- Sontheimer, H (1994). "Voltage-dependent ion channels in glial cells". *Glia*, **11**:

156-172.

Sontheimer, H (1995). "Ion channels in inexcitable cells". *The Neuroscientist*, **1**(2): 64-67.

Sontheimer, H. y Ritchie, J. M. (1995). "Voltage-gated sodium and calcium channels". *Neuroglia (Capítulo 12)*. Editores: Kettenmann, H. y Ransom, B. R. . Oxford University Press.

Sontheimer, H.; Black, J. A. y Waxman, S. G. (1996). "Voltage-gated Na⁺ channels in glia: properties and possible functions". *Trends in Neuroscience*, **19**: 325-331.

Thio, C. L.; Waxman, S. G. y Sontheimer, H. (1993). "Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. III. Modulation of channel expression by coculture with neurons and neuron-conditioned medium". *Journal of Neurophysiology*, **69**: 819-831.

Urbano, F. J.; Sierra, F.; Colombo, J. A.; Velasco, J. M. y Buño, W. (1997a). "Different voltage-gated sodium currents are expressed by human Neuroblastoma NB69 cells when cultured in defined serum-free and in astroglial-conditioned media". *Glia*, **19**(2): 161-170.

Urbano, F. J.; Sierra, F.; Velasco, J. M. y Buño, W. (1997b). "Differential expression of voltage-gated Ca²⁺ conductances in human neuroblastoma NB69 cells cultured in defined serum-free and astroglial-conditioned media". *Glia*, **20**(1): 70-78.

Valverde, F. y López Mascaraque, L. (1991). "Neuroglial arrangements in the

olfactory glomeruli of the hedgehog". *The Journal of Comparative Neurology*, **307**: 658-674.

Westenbroek, R. E.; Baush, S. B.; Lin, R. C.; Franck, J. E.; Noebels, J. L. y Catterall, W. A. (1998). "Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in reactive astrocytes after injury, hypomyelination, and ischemia". *Journal of Neuroscience*, **18**(7): 2321-2334.

Wilson, G. F. y Chiu, S. Y. (1993). "Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve". *Journal of Physiology*, **470**: 501-520.